

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular



**PAPEL DE LA FOSFATASA CELULAR DUSP1 EN
LA INFECCIÓN POR EL VIRUS VACCINIA**

Ana Cáceres Núñez



CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA

Madrid, Abril de 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**PAPEL DE LA FOSFATASA CELULAR DUSP1 EN LA
INFECCIÓN POR EL VIRUS VACCINIA**

**Memoria presentada por Ana Caceres Nuñez
Para optar al grado de Doctor en Ciencias por la
Universidad Autonoma de Madrid**

Madrid, Abril 2013



El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la dirección del Dr. Mariano Esteban.

Madrid, Abril 2013

Fdo. Mariano Esteban

A mi hermano

AGRADECIMIENTOS

La ciencia es como irse de viaje, llenas la maleta de ganas de hacer cosas nuevas, de las cosas que crees que va a necesitar, de otro montón de cosas que al final no sirven para nada...y te lanzas a la aventura. Por el camino te tropiezas con unas cuantas piedras, a veces una y otra vez, y cuando ya todo va sobre ruedas, el viaje llega a su fin. Ahora que ya ha acabado mi primer viaje por la ciencia me gustaría dar las gracias a todos aquellos que han hecho los días horribles algo menos malos y los días buenos sencillamente increíbles.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a Mariano Esteban, porque sin la oportunidad que me dio no podría haber llegado hasta aquí. Gracias por la libertad que nos das a la hora de trabajar y por tener siempre la puerta abierta para escucharnos. Creo que después de todos estos años ya nos entendemos mucho mejor.

En segundo lugar a Susana Guerra, por hacerme ver la importancia del buen hacer tanto científico como personal.

Y, por supuesto, a los miembros del laboratorio que durante estos años me han apoyado de una manera u otra aportando lo mejor de sí mismos, porque todos y cada uno de ellos me han enseñado algo que me ha hecho aprender. Vaya donde vaya siempre os echaré de menos.

Gracias a mis codirectoras de tesis no oficiales, Carmen y Bea, porque es un lujo trabajar con gente como vosotras. Bea, prepárate que aquí no hace falta ser concisa ni breve, gracias por intentar convertirme en una “señorita”, por dejarme la tesis niquelada, por atender todas mis millones de consultas a todas horas, por los brunch y por ser mi amiga dentro y fuera del laboratorio, a ver cuando inventan un “Tele-Perdiguero” porque yo te voy a echar mucho de menos. Carmen, con el tiempo ya estoy un poco menos “sodda,” gracias por compartir tus cosas con nosotros como si fuésemos tu familia y gracias porque vales tu peso en oro y nos lo demuestras todos los días ayudando con las ganas que lo haces a la gente que te rodea. Aunque no os lo diga nunca, os aprecio un montón.

A mi compañero de bata verde, cajones varios e hipocondria general, Lucas, gracias por poner banda sonora a mis días en el laboratorio y por las cosas que no tienen precio y que a veces sí hay que decir en voz alta; por lo que dijiste e hiciste en su momento por mí y por haber vivido como propios parte de mis desgracias y mis triunfos.

Gracias a Juanito, por tu talante y tus ganas de compartir tu pasión por la montaña con los demás, por llevarnos a lo más alto en cada viaje, literalmente. A Mariví por todas las cosas que me has enseñado de una manera tan profesional y

desinteresada. A Ernesto, por preocuparte siempre por mis experimentos y por poner buena cara independientemente de la que ponga yo. Y, por supuesto, a Chogüi por tu labor en cultivos y por aportar siempre un toque de diversión.

No podría olvidarme de mis ex compañeros de laboratorio como JLNajera, porque el mundo de la ciencia no sabe bien lo que se pierde sin ti...gracias por dejarnos tu tesis que algunos ya hemos desgastado de tanto leerla, por tus charlas constructivas/destructivas a última hora de la tarde y, sobre todo, gracias por habernos dedicado tanto tiempo a los demás, incluso cuando el tiempo no te sobraba...A Magda, por el cariño y la ayuda de tantos años, no sabes lo que te echo de menos en el pasillo del fondo. Gracias también a Inés, por estar tan loca y por portarte como una segunda madre conmigo, espero no perderte de vista nunca. A Jose Manuel, por tu apoyo incondicional y por hacerme ver los problemas, los experimentos y los desafíos desde otro punto de vista, siempre más positivo que el mío. Gracias a Rubén, por simplificar las cosas que yo solita complico, por pacificar y por ser tan cabezota/brutito que a veces viene bien. A Alberto Fraile, gracias por enseñarme tanto y, sobre todo, tan bien. Y a Elena, por tu ayuda en los comienzos, junto con Eva, y esos arrays sin los que DUSP1 nunca habría existido. A Alex, por mediar en las tragedias cuando las cosas se ponían feas.

Pasamos tantas horas en este edificio de ventanitas verdes que todo sería más difícil sin contar con compañeros de otros laboratorios. Me gustaría dar las gracias a la gente del 114, en especial a Jazmina, por todos los buenos momentos tanto científicos como personales que hemos pasado juntas, creo que nos sabemos la tesis la una de la otra como la nuestra propia, por estar ahí incluso estando lejos, por protegerme con tus consejos, por...A JLM, por regalarme el doctorado según puse el primer pie en el CNB, ja, ja, y por acogerme, entenderme y cuidarme en el momento apropiado. A Aitor, buen chaval donde los haya, te acabas de ir y yo ya te echo de menos por la planta...¿cuándo quedamos?. Y a Kike, ya sabes, carpe diem. Gracias a mi compañera de universidad y trabajo, Mai, por el cariño con el que tratas a tus amigos, por transmitirme tanta energía positiva, por llegar igual de tarde que yo a todas partes y por ese viaje casi terapéutico que nos hemos marcado, coquí, coquí. Y a una de las personas que más me hace falta por aquí, Ángela, muchas gracias por levantarme el ánimo tantas veces, por hacerme valer, por arreglar conmigo el mundo hablando de lo humano y lo divino mil y una noches, por enseñarme la teoría del “tronco hueco” y por demostrar con creces que hace falta involucrarse en los problemas de los otros para llegar a una solución. Cuando quieras nos volvemos unas científicas locas, llamamos a Mai, y nos montamos un chiringuito en la playa.

Gracias también a mis compañeros de viaje de la RIS, en especial a Mar, por

integrarme en su grupo y por tantas charlas-debate mientras engullíamos pastitas, paseábamos por la ciudad de turno o exponía algún que otro conferenciante, je, je. Con gente como vosotros da gusto ir de congreso.

Sería imposible recordar mi paso por el CNB sin mencionar la calidad humana de Socorro, los buenos gestos y las mil palabras de ánimo, gracias por sacarme una sonrisa en los peores momentos y por tener siempre un momento para mí. Gracias a la gente que hace que todo sea más fácil en el día a día como la gente del animalario, Antonio, Sonia y Javi. Antonio, mil gracias por trabajar tan bien y ser tan amable. O a la gente de citometría, M^aCarmen y Sara. Sarita, ¿no quieres emigrar conmigo a otro país? Eres más maja que las pesetas, ya sabes que tienes una amiga allá donde vaya.

Muchísimas gracias a Bea por todas esas noches frikis con Jazmina en las que nos lo hemos pasado taaaaan bien, por tener ese punto de rareza/locura/amistad que te hace especial y gracias porque junto con Marina, sois unas DUSPólogas sufriendoras como yo con las que he compartido numerosas dudas, hipótesis y lloros varios. Gracias por aportar un granito de arena tan importante a esta tesis.

A mis amigos de la Universidad, Mar, Richie, Noe, Mai, Varillas, Ele, Dani, Nacho, Mada y Juan por ser mis amigos, a secas, por ser tan buena gente y por lo bien que nos lo hemos pasado siempre. Madilla, prima, ¡qué meriendas en el CNB! Muchas gracias Nacho, no hay suficientes palabras en esta tesis para describir lo bien que me tratas siempre y lo mucho que lo aprecio, espero tenerte cerca siempre. A Juanito, porque a pesar de ser el tipo más desastroso del planeta, eres mi consejero preferido y siempre has estado ahí para recoger mis trocitos y volverme a recomponer. Y a Nani, por ser tan sencillo, sensato y tan buena persona.

Gracias a Cahlo y a Santi porque aunque no compartan mi vida científica llevan muchos años compartiendo mi vida personal. Santi, aunque hablamos poco y te veo menos aún, me parece que eres una de las mejores personas que uno se puede encontrar en la vida. Y Cahlo, como ya he cubierto el cupo de enfados contigo, ya sólo pueden quedar buenos momentos, y te agradezco que a pesar de esos enfados me hayas llamado infinitas veces porque no tan en el fondo, eres un buen tipo.

Gracias a Mar y a Idoia, por compartir una vida conmigo, por ser las personas que mejor me conocen y aún así me siguen queriendo, je, je. Porque para quererme hay que tragarse mucha mucha chapa y eso no lo hace cualquiera y lo sé y lo valoro cada vez más. Espero que dentro de muchos años, me sigáis apreciando cuando sea una viejita cascarrabias. Gracias por apoyarme en los momentos malos y por alegraros conmigo y por mí en los momentos buenos. Estoy segura que si en el futuro tuviese la suerte de escribir otros agradecimientos, suscribiría estas palabras una por una de nuevo.

A Alex y Sani, por ejercer de extensión de Javi y mía a la perfección.

A Enzito.

Y, por último, a las tres personas que más quiero y más admiro, a mis padres y a mi hermano. A mi madre, por predicar con el ejemplo y por poder con todo y más, por la infinita paciencia, disposición y cariño con una raspilla como yo, porque eso es un gran mérito con lo difícil que soy a veces. A mi padre, porque poquita gente puede presumir de un padre tan indescritiblemente genial como tú y porque sin ti nunca podría haber comparado la ciencia con un viaje. Y a mi hermano, Javi, por ser el único no científico que sabe que DUSP1 es una fosfatasa, por convivir conmigo estos años en paz y armonía, más o menos, y por hacer de hermano mayor/asesor/cocinero/despertador...tantas y tantas veces. Os quiero muchísimo a los tres.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido deoxirribonucleico.
ADNc: ADN complementario.
ALVAC:
Ara-C: Arabinofuranosil-citidina.
ARN: Ácido ribonucleico.
ARNdc: Ácido ribonucleico de doble cadena.
ARNm: ARN mensajero.
BAL: lavado broncoalveolar.
BHK21: baby hamster kidney 21.
BSA: Suero de albúmina bovina.
BSC40: células de riñón de mono verde 40.
C: Crestas.
°C: Grados centígrados.
C_t: Ciclo de corte.
CCL: Chemokine (C-C motif) ligand.
CDi: Células dendríticas inmaduras.
CEF: Fibroblastos embrionarios de pollo.
CHX: Cicloheximida.
CNB: Centro Nacional de Biotecnología.
CSIC: Centro superior de investigaciones científicas.
CVA: Virus Ankara corioalantoideo.
DAB: Diaminobencidina.
DF1: fibroblastos inmortalizados de pollo.
DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco.
dNTP: desoxirribonucleótidos trifosfato.
DUSP1: Fosfatasa de especificidad dual 1.
EC: Efecto citopático.
EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético.
ELISA: Ensayo de inmunoadsorción enzimática.
ERK: Extracellular regulated kinase.
FACS: Citometría de flujo.
FCS: Suero fetal de ternera.
FITC: Isotiocianato de fluoresceína.
GTP: guanosine triphosphate.
Hpi: Horas post-infección.
HPRT1: hipoxantina fosforibosiltransferasa 1.
ICS: Marcaje intracelular de citoquinas.
ICTV: Comité internacional de taxonomía de virus.
IF: inmunofluorescencia.
IFN: Interferon.
IL: Interlequina.
i.n: Intranasal.
i.p: Intraperitoneal.
JNK: c-JUN N-terminal kinase.
Kb: Kilobase.
KIM: motivo de interacción con quinasa.
KO: Knock-out (carente).
LD50: Dosis letal 50.
LPS: Lipopolisacárido.
mA: Miliamperios.
mM: Milimolar.

MAPK: Quinasa activada por mitógeno.
MAPKAPK: Quinasa activada por MAPK.
MAPKK: MAP quinasa quinasa.
MAPKKK: MAP quinasa quinasa quinasa.
MDI: Multiplicidad de infeccion.
MEF: Fibroblasto embrionario murino.
Ml: Mililitro.
Mg: Miligramo.
Min: Minuto.
MVA: Modified virus Ankara.
MyD88: Myeloid primary response gene 88.
NALP3: NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3.
NCS: suero de ternera recién nacida.
NFATc: Nuclear factor of activated T-cells.
OMS: Organización mundial de la salud.
ORF: Marco de lectura abierta.
PBS: Solución salina tamponada con fosfato.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
PM: Peso molecular.
QT-35: quail tail 35.
RD: Real decreto.
r.p.m: Revoluciones por minuto.
RT-PCRq: retrotranscripción y PCR cuantitativa.
Seg: Segundo.
SDS-PAGE: gel de poliácridamida con dodecil sulfato sódico.
SIV: Virus de la inmunodeficiencia de simios.
SPICE: Simplified presentation of incredibly complex evaluations.
TGF: Factor de crecimiento tumoral.
Th: T ayudadora.
TK: Timidín-quinasa.
TLR: receptor de tipo Toll.
TNF: Factor de necrosis tumoral.
TRIF: TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- β
TROVAC:
UFP: Unidad formadora de placa.
UNIDs: Unidades.
URL: Unidades relativas de luciferasa.
V: Viroplasma.
VACV: Vaccinia virus.
VE: Virus extracelular.
VI: Virión inmaduro.
VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.
VIN: Virión inmaduro con nucleoide.
VM: Virión maduro.
VME: Virión maduro con envuelta.
WB: Western-blot.
WR: Western Reserve.
WT: Wild-type (salvaje).

ÍNDICE

I. RESUMEN EN INGLÉS	1
II. INTRODUCCIÓN	5
1) Poxvirus: Clasificación y características generales	5
2) El virus vaccinia (VACV)	6
2.1) Estructura y morfología	6
2.2) Organización genómica	7
2.3) Ciclo infectivo	8
3) Aplicaciones de los Poxvirus	13
4) Cepas atenuadas de vaccinia	14
4.1) Virus modificado de Ankara (MVA)	14
4.2) Virus atenuado de la cepa Copenhagen (NYVAC)	15
5) El virus vaccinia y su hospedador	18
6) MAPKs: características principales y regulación	19
7) Fosfatasa de especificidad dual 1 (DUSP1)	22
III. OBJETIVOS	29
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	33
1) Materiales biológicos	33
1.1) Células	33
1.1.1) <i>Líneas celulares</i>	33
1.1.2) <i>Medios de cultivo</i>	33
1.1.3) <i>Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)</i>	33
1.1.4) <i>Obtención de esplenocitos murinos</i>	34
1.2) Virus	34
2) Reactivos	35
2.1) Anticuerpos	35

2.2) Oligonucleótidos.	35
2.3) Péptidos.	35
2.4) Tampones	35
2.5) Otros reactivos	37
3) Métodos	38
3.1) Manipulación de ADN	38
3.1.1) <i>Purificación de ADN</i>	38
3.1.2) <i>Amplificación por PCR (reaccion en cadena de la polimerasa)</i>	38
3.1.3) <i>Electroforesis en geles de azarosa</i>	38
3.2) Manipulación de ARN	40
3.2.1) <i>Purificación de ARN</i>	40
3.2.2) <i>Reacción de la Transcriptasa reversa</i>	40
3.2.3) <i>Cuantificación relativa de ARN mediante PCR a tiempo real</i>	40
3.3) Manipulación de proteínas	41
3.3.1) <i>Purificación de proteínas</i>	41
3.3.2) <i>Análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE e inmunodetección (Western-blot)</i>	41
3.3.3) <i>Inmunofluorescencia</i>	42
3.4) Manipulación de virus	42
3.4.1) <i>Crecimiento, purificación y titulación de virus</i>	42
3.4.2) <i>Análisis de la replicación viral. Curvas de crecimiento</i>	43
3.4.3) <i>Estudio del efecto citopático producido por VACV</i>	43
3.4.4) <i>Microscopía electrónica</i>	44
3.5) Manipulación de animales	44
3.5.1) <i>Protocolos de inmunización</i>	45
3.5.2) <i>Colonia de ratones DUSP1: características y genotipado</i>	45
3.5.3) <i>Obtención de muestras de los animales inmunizados</i>	45
3.5.4) <i>Evaluación de la patogenicidad viral</i>	46
3.5.5) <i>Análisis de la replicación viral. Determinación de los niveles de luciferasa</i>	47
3.5.6) <i>Evaluación de la secreción de citoquinas de células T</i>	47
3.5.7) <i>Evaluación de los niveles de citoquinas mediante</i>	

<i>ELISA y LUMINEX</i>	48
3.6) Análisis estadístico	48

V: RESULTADOS

1) Análisis del comportamiento <i>in vitro</i> del virus vaccinia en presencia o ausencia de DUSP1	51
1.1) La infección por el virus vaccinia induce la expresión de DUSP1 en células en cultivo	51
1.1.1) <i>La infección por VACV induce la expresión de DUSP1 a nivel de ARNm y a nivel de proteína</i>	51
1.1.2) <i>La síntesis de proteínas virales tempranas es necesaria para la inducción de DUSP1</i>	52
1.1.3) <i>La infección por VACV induce la fosforilación de DUSP1 a través de la quinasa celular ERK</i>	53
1.2) Análisis del crecimiento de VACV en presencia o ausencia de DUSP1 en células murinas en cultivo	56
1.2.1) <i>El crecimiento viral de los virus WR y MVA es mayor en ausencia de DUSP1</i>	56
1.2.2) <i>El virus atenuado MVA es capaz de liberar su progenie al medio extracelular en ausencia de DUSP1 en células murinas en cultivo</i>	57
1.2.3) <i>La infección por MVA en ausencia de DUSP1 induce efecto citopático en células murinas en cultivo</i>	57
1.3) Estudio de la morfogénesis viral en presencia o ausencia de DUSP1	59
1.3.1) <i>DUSP1 no está implicada en eventos tempranos del proceso de morfogénesis de MVA. Análisis de la expresión de las proteínas A14 y A17 mediante microscopía confocal</i>	59
1.3.2) <i>DUSP1 no está implicada en el procesamiento proteolítico viral. Análisis de la expresión de las proteínas L4, A10 y A17 mediante Western-blot</i>	61
1.3.3) <i>DUSP1 está implicada en eventos previos a la formación del virión maduro. Análisis de la expresión de la</i>	

<i>proteína A27 mediante microscopía confocal</i>	63
1.3.4) DUSP1 está implicada en la transición VIN-VM. Análisis del proceso de morfogénesis viral en presencia o ausencia de DUSP1 mediante microscopía electrónica	65
1.4) Estudio de la activación de las MAPKs durante la infección por VACV en presencia o ausencia de DUSP1	69
1.4.1) VACV induce un incremento en la activación de las MAPKs en ausencia de DUSP1	69
1.4.2) La activación de las MAPKs contribuye a la infección productiva de MVA en ausencia de DUSP1	71
2) Análisis de la patogenicidad y la respuesta inmune inducida por el virus vaccinia en presencia o ausencia de DUSP1	72
2.1) Los ratones DUSP1 KO son más susceptibles a la infección por WR que los ratones WT. Análisis de la patogenicidad y del rendimiento viral mediante ruta intranasal	72
2.2) MVA y NYVAC no llevan a cabo infecciones productivas ni en presencia ni en ausencia de DUSP1 en el modelo murino	75
2.2.1) Ruta intranasal e intraperitoneal	76
2.2.2) Ruta de escarificación en la base de la cola	76
2.3) DUSP1 está implicada en la regulación de las respuestas inmunes innata y adaptativa frente a VACV	79
2.3.1) Ruta intranasal	80
2.3.2) Ruta intraperitoneal	80
VI: DISCUSIÓN	87
VII: CONCLUSIONES	99
VIII: BIBLIOGRAFÍA	103
IX: ANEXO	121

I. RESUMEN EN INGLÉS

I. RESUMEN EN INGLÉS

Poxviruses encode a large variety of proteins that mimic, block or enhance host cell signaling pathways on their own benefit. It has been reported that mitogen-activated kinases (MAPKs) are specifically up-regulated during vaccinia virus (VACV) infection. In this study, we have evaluated the role of the MAPK negative regulator dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) in the infection of VACV. The results presented in this thesis demonstrate that DUSP1 mRNA transcription and protein expression are enhanced upon infection with wild-type (WT) virus WR or with the attenuated VACV mutants MVA and NYVAC and this up-regulation is dependent on early viral protein synthesis. In the absence of DUSP1 in cultured cells, there is an increased activation of its molecular targets p38MAPK, JNK and ERK and an enhanced WR replication. Moreover, DUSP1 knock-out (KO) mice are more susceptible to WR infection probably as a result of the enhanced virus replication that we observed in the lungs from KO infected animals. Interestingly, MVA which is known to perform non-permissive infections in most mammalian cell lines, is able to grow in KO immortalized murine embryo fibroblasts (MEFs) and this ability is completely abrogated when DUSP1 expression is restored in cultured cells. Confocal and electron microscopy assays showed that, in the absence of DUSP1, MVA morphogenesis is similar as in permissive cell lines. By the specific inhibition of MAPKs during MVA infection of KO cells, we have determined that the activation of MAPKs is at least partially responsible for the ability of MVA to replicate in the absence of DUSP1. In addition, we observed an increment in the secretion of pro-inflammatory cytokines at early times post-infection and an enhancement in the adaptive immune response when we infected KO mice by different routes. Altogether, these findings revealed that DUSP1, through the modulation of MAPKs, is involved in the replication and host range of VACV and in the regulation of host immune responses. Thus, DUSP1 is a host factor that acts as an antiviral defense mechanism against a poxvirus infection.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

1) Poxvirus: Clasificación y características generales.

Los poxvirus constituyen una extensa familia de virus capaces de infectar una amplia variedad de vertebrados e invertebrados. Se caracterizan principalmente por presentar un genoma lineal de ADN de doble cadena, ser capaces de replicar en el citoplasma de la célula infectada y poseer un virión de morfología compleja.

De acuerdo con la última actualización taxonómica establecida anualmente por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), la familia *Poxviridae* está dividida en dos subfamilias: *Entomopoxvirinae*, capaz de infectar insectos (Li et al, 1998) y *Chordopoxvirinae*, capaz de infectar aves y mamíferos. La subfamilia *Chordopoxvirinae* se divide a su vez en 10 géneros entre los que se encuentra el género *Orthopoxvirus* (Fig.1).

El miembro más conocido del género *Orthopoxvirus* es el virus Variola, agente causante de la pandemia de la viruela, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera oficialmente erradicada desde 1980 (Jezek et al, 1987), (Jezek & Khodakevich, 1987). Sin embargo, el prototipo y, por tanto, el miembro más estudiado de la familia es el virus Vaccinia (VACV). Fue el primer virus en ser analizado mediante un microscopio electrónico, crecido en cultivos celulares de forma estable, físicamente purificado y analizado químicamente (Moss, 2001). La sintomatología de la infección en humanos es leve con la aparición de pústulas y procesos febriles.

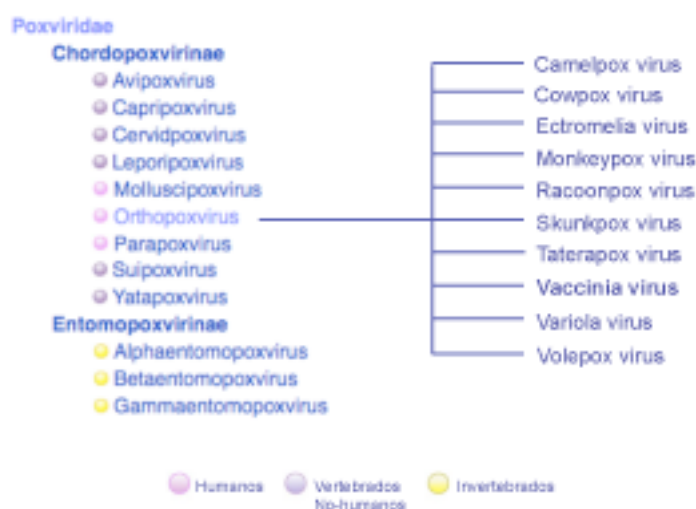


Figura 1: Clasificación taxonómica de la familia Poxviridae.

2) El virus vaccinia (VACV).

2.1) Estructura y morfología.

Según estudios de tomografía crioelectrónica llevados a cabo en nuestro laboratorio (Fig.2A), la partícula viral de VACV presenta unas dimensiones de 370 x 260 x 125 nm (Cyrklaff et al, 2005) y tiene una morfología ovalada o en forma de ladrillo (Dales & Pogo, 1981). Dentro de una célula infectada, VACV puede encontrarse en dos formas infectivas diferentes: el virión maduro (VM) que posee una única membrana y que permanece en el citoplasma hasta que se produce la lisis celular y el virus extracelular (VE) que tiene una membrana adicional y que se libera mediante la fusión de su membrana exterior con la membrana plasmática. La composición de las membranas de ambas formas infectivas es diferente y, por lo tanto, los VMs y los VEs son estructural, antigénica y funcionalmente distintos (Smith et al, 1997), (Seet et al, 2003). En cuanto a la diseminación del virus, el VM es responsable de la estabilidad del virus a largo plazo y de la transmisión del virus entre hospedadores, mientras que el VE es importante para la dispersión del virus dentro del organismo infectado (Payne & Kristensson, 1985).

Los análisis de la arquitectura interna de los VMs mediante microscopía electrónica y tomografía crioelectrónica han permitido la identificación de tres subestructuras diferentes: el core, los cuerpos laterales y la membrana externa (Fig.2B). El core es una zona central bicóncava, electrodensa y altamente estructurada que contiene proteínas virales asociadas al compacto genoma viral junto con la maquinaria transcripcional necesaria para llevar a cabo los primeros estadios de la transcripción viral (Condit et al, 2006), (Jensen et al, 1996). El core se encuentra rodeado por una membrana cuya cara externa presenta una apariencia estriada y numerosas espículas tapizando su superficie. Los cuerpos laterales son subestructuras proteicas situadas a ambos lados del core y en contacto tanto con la membrana externa del mismo (Griffiths et al, 2001b), (Griffiths et al, 2001a) como con la membrana externa del VM. La membrana externa del virión presenta un grosor de 5-6 nm y está formada por túbulos agrupados de forma hexagonal. Se encuentra mayoritariamente compuesta por proteínas estructurales y en menor proporción por proteínas implicadas en el sistema redox viral responsable del mantenimiento de las uniones disulfuro de la membrana. La membrana adicional del VE es lábil, presenta una composición lipídica y al menos 6 proteínas virales que no se encuentran presentes en la membrana del VM. Estas proteínas virales son necesarias para el enmascaramiento del virus frente al sistema inmune del hospedador y para la entrada del virus en la célula (Payne, 1978).

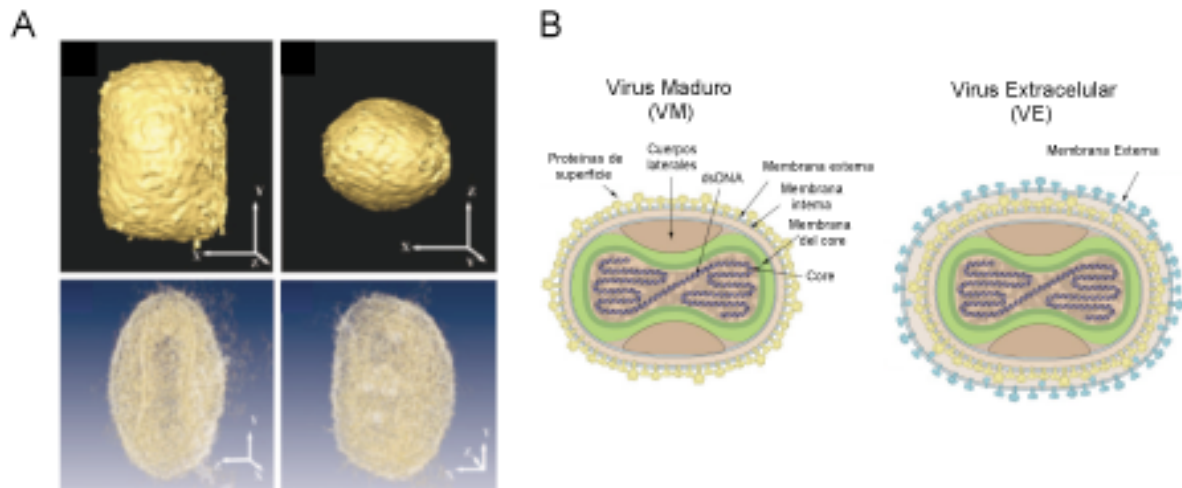


Figura 2: Estructura y morfología del virión maduro de VACV. A) Imágenes obtenidas por tomografía electrónica. **B)** Representación gráfica de la arquitectura general y las subestructuras de VACV (adaptado de Swiss Institute of Bioinformatics, 2008).

2.2) Organización genómica.

El genoma de VACV tiene un tamaño de 62,3 μM y consta de aproximadamente 200 kb de longitud que codifica alrededor de 200 genes (Esteban et al, 1977) (Goebel et al, 1990). La molécula de ADN viral bicatenario tiene sus extremos unidos de forma covalente mediante horquillas que se localizan en las regiones terminales invertidas. El ADN viral se encuentra en una conformación superenrollada asociado a proteínas virales formando estructuras esféricas de 30-60 nm de diámetro (Soloski & Holowczak, 1981).

Tras la publicación de la primera secuencia genómica completa de un virus vaccinia, concretamente la correspondiente a la cepa Copenhagen (Goebel et al, 1990), se adoptó la nomenclatura oficial de los genes virales según la cual los distintos genes se nombran de acuerdo con el fragmento obtenido mediante la digestión con la enzima de restricción HindIII en el que se localizan (representado por una letra en mayúscula), con la posición relativa de dicho gen con respecto al extremo izquierdo de dichos fragmentos (representado por un número) y en relación a su orientación transcripcional (L; left, R; right). A partir del estudio comparativa de los genomas de diferentes poxvirus se ha demostrado que hay 91 genes conservados entre los miembros de la familia *Chordopoxvirinae*. La mayoría de ellos se encuentran localizados en la región central del genoma y están implicados en funciones esenciales durante la infección del virus. Sin embargo, los genes no esenciales están situados en los extremos del genoma y sufren una mayor variabilidad entre especies, siendo responsables del rango de hospedador y de la patogenicidad específicos de cada virus (Seet et al, 2003).

2.3) Ciclo infectivo.

Los poxvirus, a diferencia de otros virus ADN, disponen de una batería de proteínas virales que les permiten completar su ciclo infectivo en el citoplasma de la célula infectada (Moss, 2001). En la Fig.3 se representan las distintas etapas del ciclo infectivo del virus: entrada, desencapsidación, expresión génica y replicación del ADN viral y finalmente, morfogénesis y salida de la progenie viral.

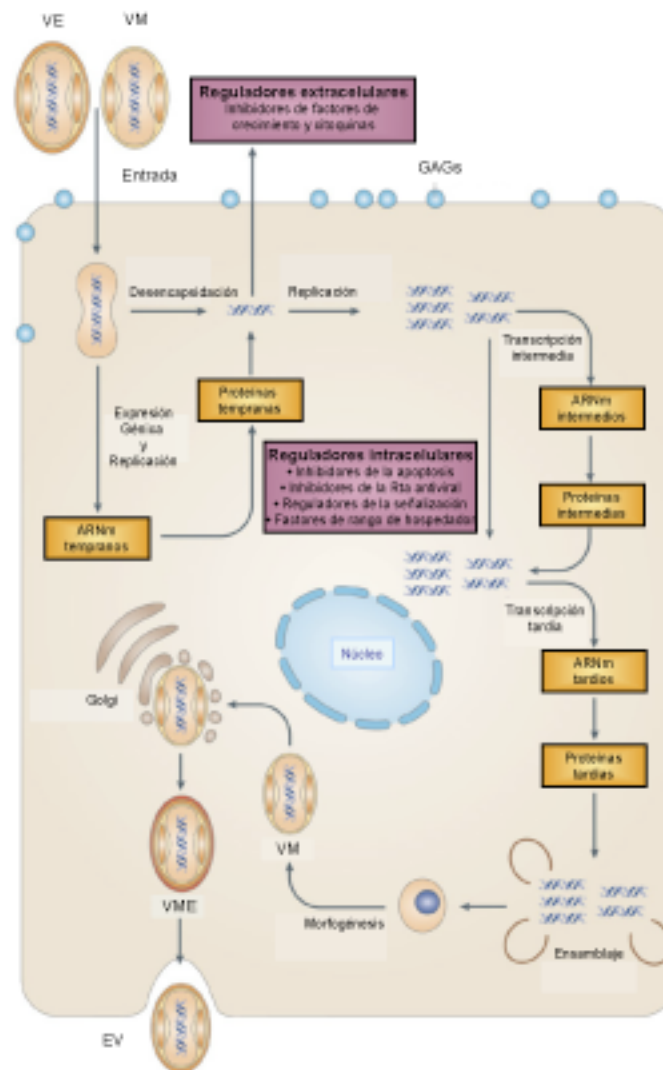


Figura 3: Ciclo infectivo de VACV. En el esquema se representan los distintos estadios que forman parte del ciclo infectivo de VACV en un hospedador permisivo. Figura adaptada de McFadden, 2005.

Entrada

En el caso de VACV es necesario considerar la existencia de dos formas infectivas diferentes: VM y VE. Se ha descrito que la membrana externa del VE se disgrega previamente a la entrada del virus por un mecanismo mediado por ligando en el que están implicadas las glicoproteínas virales A34 y B5 (Law et al, 2006). Todavía se desconoce el receptor celular específico responsable del reconocimiento de los poxvirus, pero se ha descrito que el VM entra en la célula mediante mecanismo de endocitosis dependiente de pH, ya sea a través de la fusión de su membrana externa con la membrana plasmática (pH netro) o mediante la fusión con la membrana de endosomas en los que se invagina durante la entrada (pH ácido). Las proteínas virales de envuelta implicadas en el acoplamiento del virus a la célula son D8, A27, H3 y A26 (Moss, 2012

). En el caso de la cepa WR la ruta endocítica es la predominante (Townesley et al, 2006). Sin embargo, un estudio reciente sugiere que la entrada de los VMs y VEs sucede mediante un mecanismo de endocitosis celular dependiente de pH (Schmidt et al, 2011) en el que ambas formas virales se sirven del mismo mecanismo de entrada, pero difieren en la manera en la que activan la macropinocitosis celular (Schmidt et al, 2012).

Un complejo de ocho proteínas virales de envuelta presentes en la membrana del VM y que interaccionan entre sí son las encargadas de mediar la liberación del core y los cuerpos laterales en el citoplasma de la célula infectada (Townesley et al, 2005), (Senkevich et al, 2005). Este complejo está compuesto por las proteínas virales A21, L5, A28, H2, G3, G9, A16 y J5. Los mutantes inducibles generados para analizar la función de estas proteínas indican que estas no son necesarias para la formación de un virión maduro morfológicamente normal y transcripcionalmente activo. Sin embargo, los VMs mutantes no son capaces de penetrar en la célula y, por tanto, no son infectivos.

Desencapsidación

Este proceso consiste en la liberación del core viral en el citoplasma de la célula infectada. Se trata de un proceso parcial en el que se produce la pérdida de lípidos y proteínas de la envuelta del virión (Dales, 1965) lo que conlleva una mayor accesibilidad del genoma a la acción de las nucleasas de ADN presentes en el citoplasma celular (Joklik, 1962).

Expresión génica y síntesis de ADN viral

La expresión de las distintas proteínas virales es un proceso complejo de eventos que

tiene lugar integramente en el citoplasma de la célula infectada. Una infección permisiva se caracteriza por tres etapas de transcripción y síntesis de proteínas virales: temprana, intermedia y tardía (Broyles, 2003).

1) Expresión de genes tempranos

Aproximadamente la mitad de los genes codificados en el genoma del virus se transcriben de forma temprana. Un estudio reciente demuestra que estos genes se pueden subdividir en genes inmediatamente tempranos y tempranos (Assarsson et al, 2008).

La ARN polimerasa viral y los factores necesarios para llevar a cabo la transcripción temprana se encuentran empaquetados en el VM (Christen et al, 1992).

Las proteínas sintetizadas a partir de estos ARNm tempranos están implicadas en la replicación del ADN viral, en contrarrestar la defensa antiviral del hospedador y en la transcripción de los genes intermedios.

2) Replicación del ADN viral.

Este proceso tiene lugar durante las dos primeras horas a partir de la entrada del virus en regiones citoplasmáticas próximas al núcleo y desprovistas de orgánulos celulares denominadas factorías virales (Cairns, 1960). Durante las primeras etapas de la infección las factorías virales se encuentran rodeadas por el retículo endoplasmático rugoso que comienza a disgregarse durante la transcripción intermedia (Tolonen et al, 2001).

El modelo de replicación de los poxvirus comienza con un corte, mediado por proteínas virales tempranas, en una de las hebras de ADN que permite a la ADN polimerasa viral iniciar la elongación desde el extremo 3' libre producido tras el corte. A continuación, la molécula replicada de ADN se vuelve sobre sí misma de manera que se produce la formación de concatémeros. En una segunda etapa, mediada por proteínas virales tardías (Merchinsky & Moss, 1989), estos intermediarios de replicación se resuelven por la proteína viral A22 (García et al, 2000), dando lugar a moléculas individuales de ADN viral maduras con los extremos sellados y con secuencias invertidas y complementarias en ambos extremos (Traktman, 1991) que se incorporarán posteriormente en las partículas virales.

3) Expresión de genes intermedios.

Los genes intermedios representan un pequeño porcentaje en comparación con los tempranos y tardíos y codifican mayoritariamente proteínas reguladoras que inducen la transcripción de los genes tardíos.

4) Expresión de genes tardíos.

Los genes tardíos codifican la mayoría de las proteínas que forman parte de las partículas virales y las enzimas que se empaquetan en el virión implicadas en comenzar la transcripción temprana una vez que éste infecte a una nueva célula.

Los transcritos presentan algunas características inusuales como unos extremos 5' poliadenilados y unos extremos 3' heterogéneos en longitud. Además, este ARN es capaz de hibridar consigo mismo y formar moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc) debido a un proceso de transcripción opuesta de ambas hebras de ADN y a la heterogeneidad de los extremos 3'. El virus vaccinia es capaz de contrarrestar la respuesta del hospedador ante la presencia de estos ARNdc virales mediante la acción de proteínas virales tempranas como E3 y K3 (Davies et al, 1993).

Morfogénesis y salida de la progenie

La morfogénesis del virus vaccinia es un proceso complejo que se produce en varias etapas secuenciales y que comienza en las factorías virales (Tolonen et al, 2001). La secuencia de acontecimientos que conforman este proceso se observó por primera vez mediante microscopía electrónica (Dales, 1965). En la Fig.4 se muestra un esquema secuencial del proceso de morfogénesis de VACV.

Las primeras evidencias de ensamblaje viral son la aparición de crestas membranosas de unos 10-15 nm de grosor. Las crestas virales están formadas por las proteínas estructurales A14 y A17 que se encuentran unidas entre sí (Unger et al, 2012) y ensambladas junto con la proteína D13, responsable de la presencia de unas proyecciones denominadas espículas (Dales & Mosbach, 1968). A14 y A17 sufren procesos de fosforilación mediados por la quinasa viral F10 y, posteriormente, son proteolizadas para dar lugar a sus formas maduras presentes en el VM (Betakova et al, 1999). Las crestas van aumentando progresivamente de tamaño mientras engloban el material vioplásmico o viroplasma dando lugar a una estructura esférica. Estos intermediarios virales se denominan virus inmaduros (VIs) y tienen aproximadamente 350 nm de diámetro. El viroplasma contenido en su interior es más electrodensito que el material que se encuentra en la factoría viral. También podemos encontrar el viroplasma en forma de grandes acumulaciones denominadas "virosomas" rodeadas por numerosas crestas membranosas en crecimiento. Mediante ensayos con mutantes dependientes de temperatura se han identificado 7 proteínas virales como proteínas esenciales durante el proceso de formación del VI: A10, A15, A30, D2, D3, G7, J1 y F10 (Condit et al, 2006).

En el citoplasma de la célula infectada también pueden detectarse otras subestructuras virales como acumulaciones de ADN viral frecuentemente rodeadas por dos membranas en forma de emparedado. El ADN viral sufre un proceso de condensación y, posteriormente, se

encapsida en el VI por un mecanismo poco caracterizado hasta el momento. Comúnmente se ha aceptado que el genoma viral entra en el VI antes de que la membrana se cierre por completo ya que la mayor parte de los viriones inmaduros encontrados en análisis de secciones seriadas de muestras de microscopía electrónica contienen un nucleoide en su interior (Morgan et al, 1955). Este nuevo intermediario viral se denomina virus inmaduro con nucleoide (VIN).

EL VIN sufre un complejo proceso de transformación morfológica para dar lugar al primer intermediario viral infectivo, el virus maduro (VM). Este proceso consta de tres eventos principales; 1) el ensamblaje de la maquinaria de transcripción en el core viral en el que están implicados las proteínas D6, A7 y H4, 2) la proteólisis de determinadas proteínas estructurales del core y de la membrana viral tales como A10, A3, G7, A12, L4 y A17 mediada por la proteasa viral I7 (Byrd & Hruby, 2006) y 3) la reestructuración de la superficie de la partícula viral en la que tiene lugar la pérdida de la proteína de ensamblaje D13, la formación de puentes disulfuro intra- e intermoleculares en proteínas virales estructurales (Bisht et al, 2010) y la incorporación de nuevas proteínas estructurales a la envuelta del virus como la proteína A27 que se ancla a la membrana mediante su unión a la proteína A17 (Kochan et al, 2008). La mayoría de los VM se encuentran agrupados en zonas independientes físicamente y en ocasiones alejadas de las factorías virales. Los VMs presentan un tamaño de unos 200-300 nm y una morfología ovalada en forma de ladrillo y permanecen en el interior de la célula infectada hasta su liberación tras la lisis celular.

Una pequeña proporción de los VMs adquiere una membrana adicional derivada de las membranas trans del aparato de Golgi y dan lugar a un nuevo intermediario viral denominado virus maduro con envuelta (VME). El transporte al aparato de Golgi está mediado por la proteína de la envuelta viral A27 (Sanderson et al, 2000) y ésta junto con las proteínas B5 y F13 son responsable de la correcta adquisición de una doble membrana adicional para dar lugar a los VMEs (Engelstad & Smith, 1993), (Blasco & Moss, 1991). Posteriormente, los VMEs son transportados mediante la red de microtúbulos hasta la periferia celular en un proceso mediado por la proteína viral F12 (Morgan et al, 2010). Una vez allí, los VMEs son capaces de atravesar el esqueleto de actina situado por debajo de la membrana plasmática (Arakawa et al, 2007) y fusionar su membrana externa con la membrana plasmática. Muchos de estos viriones permanecen unidos a la membrana celular y son capaces de infectar a las células vecinas gracias a la inducción de colas de actina en la zona subyacente al virión. En este proceso participan las proteínas virales A33, A34 y A36 (Sanderson et al, 1998). Otra proporción de los virus son liberados al medio extracelular y son responsables de la diseminación del virus a larga distancia (Blasco & Moss, 1991).

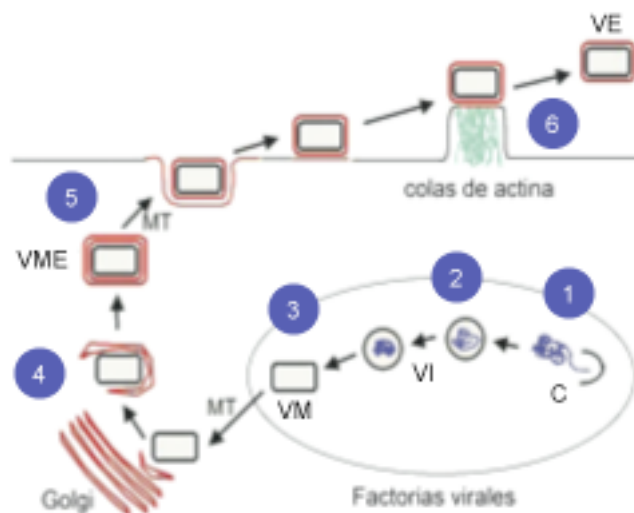


Figura 4: Esquema del proceso de morfogénesis de VACV. En la figura se representan los distintos estadios que del proceso de morfogénesis de VACV: formación de crestas (1), inclusión de ADN viral (2), formación del virus maduro (3), adquisición de una membrana adicional en el aparato de Golgi (4), transporte hasta la membrana plasmática (5) y liberación de la progenie viral de la célula infectada (6). Figura adaptada de Smith, 2002.

3) Aplicaciones de los Poxvirus.

A causa de la pandemia producida por el virus variola, agente causante de la enfermedad de la viruela, el virus vaccinia cobró una gran importancia como vacuna frente a dicha enfermedad. A comienzos de la segunda mitad del siglo XX, comenzó una campaña de erradicación de la viruela que culminó con el último caso detectado en 1977 (Fenner, 1988) y con la declaración oficial de su erradicación por la Organización Mundial de la Salud en 1980 (W.H.O, 1980).

Desde ese momento, gracias al desarrollo de la manipulación genética en el campo de la biología molecular y en concreto de la virología, el virus vaccinia fue ampliamente utilizado como vector de expresión de genes procedentes de otras especies. Ensayos realizados en el año 1996 por los grupos de B. Moss y E. Paoletti demostraron que animales inoculados con virus vaccinia que expresaban material exógeno procedente de otros patógenos eran capaces de generar protección frente a dichos patógenos (Moss, 1996), (Paoletti, 1996).

En la actualidad existen una serie de virus vaccinia modificados genéticamente con el objetivo de convertirlos en vectores más inmunogénicos y más seguros. Estos virus modificados son generalmente virus atenuados incapaces de replicar en el hospedador siendo, por lo tanto, candidatos vacunales idóneos frente a diversas enfermedades prevalentes (Gomez et al).

Las ventajas que ofrecen los poxvirus como vectores de expresión y/o vacunales se resumen en la **Tabla I**.

Ventajas de los Poxvirus como vectores	
•	Gran capacidad de inserción de ADN exógeno
•	Bajo coste de producción
•	Facilidad de generación de recombinantes altamente estables
•	Elevados niveles de expresión del antígeno heterólogo
•	Fácil distribución mundial
•	Inducción de una potente respuesta inmune humoral y celular
•	Disponibilidad de virus atenuados (MVA, NYVAC, ALVAC)

Tabla I: Ventajas de los Poxvirus como vectores de expresión y/o vacunales.

4) Cepas atenuadas del virus vaccinia.

Debido a la necesidad de obtener vectores vacunales más seguros, se han generado una serie de cepas atenuadas incapaces de replicar en células humanas y en la mayor parte de células de mamífero. Entre ellas podemos destacar: los vectores con restricciones en el rango de hospedador como el de los poxvirus atenuados ALVAC o TROVAC (Pincus et al, 1995), el de los mutantes M65 y M101 generados en nuestro laboratorio (Dallo & Esteban, 1987) o el de las cepas atenuadas MVA y NYVAC, utilizadas en el presente trabajo (Moss et al, 1996). A continuación se detallan las estrategias de obtención y las características de los dos virus atenuados utilizados durante este estudio.

4.1) Virus modificado de Ankara (MVA).

El virus modificado de Ankara (MVA) fue derivado del virus Ankara corioalantoideo (CVA) tras 570 pases sucesivos en fibroblastos embrionarios de pollo (CEF) durante los cuales el virus fue perdiendo progresivamente genes implicados en replicación y virulencia (Sutter & Staib, 2003). Los análisis del genoma de MVA realizados mediante secuenciación han demostrado que MVA ha perdido aproximadamente 30 Kb de su información genómica durante el proceso de atenuación en CEF, lo que corresponde a un 15% del genoma parental (Antoine et al, 1998), (Meyer et al, 1991).

Se ha descrito que MVA es incapaz de completar el ciclo viral en células HeLa debido a un bloqueo en el proceso de morfogénesis. Por tanto, el virus expresa tanto las proteínas virales tempranas como las tardías pero no es capaz de realizar el proceso de ensamblaje, por lo que sólo se producen un 4% de virus maduros en los cultivos de células HeLa infectadas con MVA (Gallego-Gomez et al, 2003), (Sancho et al, 2002). De hecho, la restricción en el rango de hospedador de MVA es muy amplia ya que sólo es capaz de replicar en células CEF, BHK21 y QT-35 (de origen aviar) (Drexler et al, 1998), (Verheust et al, 2012).

MVA se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de vacunas tanto de carácter preventivo como terapéutico (Gomez et al, 2008). En los últimos años se han llevado a cabo varios ensayos clínicos utilizando vacunas basadas en MVA en voluntarios sanos y en voluntarios infectados por VIH (Keefer et al, 2011), (Gomez et al, 2011b). Estos estudios han demostrado que estos vectores recombinantes basados en MVA son seguros y capaces de inducir una respuesta inmune VIH-específica cuando se administran solos o en combinación con otros vectores. En la actualidad, nuestro grupo y otros grupos de investigación están realizando modificaciones en el genoma de MVA y en los antígenos de VIH insertados en dicho genoma con el objetivo de aumentar la magnitud, la polifuncionalidad y la durabilidad de la respuesta inmune generada frente a los antígenos de VIH y conseguir así un vector vacunal más eficiente (Garcia-Arriaza et al, 2011).

4.2) Virus atenuado de la cepa Copenhagen (NYVAC).

El virus NYVAC deriva de la cepa Copenhagen y fue generado mediante la delección selectiva de 18 marcos de lectura abierta (ORF, del inglés: Open Reading Frames) del virus implicados en el rango de hospedador y en virulencia. El virus obtenido mediante esta estrategia no es capaz de replicar en células humanas en cultivo ni tampoco produce infecciones productivas en humanos (Tartaglia et al, 1992). Esta incapacidad de NYVAC para replicar en células humanas es debida al bloqueo transcripcional observado en los cultivos de células HeLa infectados con este virus atenuado. De esta manera, NYVAC no expresa algunas proteínas tardías necesarias para el proceso de morfogénesis viral por lo que dicho bloqueo transcripcional se produce previamente a la formación de los virus inmaduros. Otra característica importante de este virus atenuado es que induce una potente apoptosis que se refleja no sólo en el efecto citopático observado en los cultivos infectados, sino en el patrón de genes relacionados con apoptosis obtenido mediante análisis por microarrays (Najera et al, 2006), (Guerra et al, 2006).

En un análisis comparativo de los genomas de MVA y NYVAC podemos

observar que se han perdido o fragmentado diversos genes no esenciales y que éstos varían entre ambos virus atenuados existiendo un mayor número de genes deletados o fragmentados en el genoma de MVA que en el de NYVAC. Como se muestra en la Fig.5, encontramos genes deletados en NYVAC e intactos en MVA, genes deletados en MVA e intactos en NYVAC y genes deletados en ambos virus. Entre estos últimos se encuentran (la nomenclatura corresponde a la cepa Copenhagen) *C1L-C5L*, *N1L*, *M1L*, *M2L*, *A26L*, *B13R*, *B14R* y *K1L*. Los genes deletados en uno u otro virus son los responsables de las diferencias en los fenotipos de ambos virus; así, en MVA están presentes el gen de la timidín-quinasa (*J2R*), el gen de rango de hospedador *C7L*, el gen de la hemaglutinina (*A56R*), el de la subunidad mayor de la ribonucleótido reductasa (*I4L*) y el gen de función desconocida *N2L*, que no están presentes en NYVAC (Tartaglia et al, 1992).

En cuanto a la diseminación de MVA y NYVAC en el organismo, la característica común de ambos virus es que a pesar de ser capaces de infectar tejidos cercanos al lugar de inoculación no son capaces de producir progenie viral y, por lo tanto, no pueden diseminarse por el organismo. El análisis de la biodistribución de ambos virus en el modelo murino fue llevado a cabo previamente en nuestro laboratorio (Ramirez et al, 2003), (Gomez et al, 2007a). Estos estudios mostraron que la expresión génica de MVA es mayor a tiempos tempranos post-infección, mientras que NYVAC es capaz de mantener los niveles de expresión durante un periodo de tiempo mayor en los animales infectados, aunque nunca superior a las 72 hpi.

Las diferencias en los genes inmunomoduladores deletados o fragmentados en ambos virus atenuados dan lugar a un patrón inmunogénico distinto y, en consecuencia, el efecto que producen en la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador es también diferente. Diversos estudios de microarrays con estos virus en células HeLa y células dendríticas inmaduras (CDi) realizados en nuestro laboratorio corroboran estos hechos (Guerra et al, 2006), (Guerra et al, 2007), (Guerra et al, 2004). En CDi se observó la inducción de 359 genes de forma específica durante la infección por MVA mientras que este número se reducía a 165 en el caso de las células infectadas por NYVAC. La ruta de señalización del interferón (IFN), implicada en la defensa del hospedador, también resultaba fuertemente inducida durante la infección por MVA. Posteriormente, otros autores han profundizado en la señalización mediada por MVA, demostrando el papel que desempeña el inflamosoma NALP3, los TLR2-6 y MyD88 durante la infección con este virus atenuado (Delaloye et al, 2009).

También existen diferencias en la respuesta celular desencadenada por MVA y NYVAC. Un estudio realizado en macacos (*Macaca mulatta*) con MVA y NYVAC como vectores vacunales que contenían genes del virus de la inmunodeficiencia de simios (Klotz et al) demostró que, tras el desafío con el virus patogénico SHIV89.6P, los animales inmunizados

previamente con MVA presentaban una porcentaje mayor de células T CD8 específicas con respecto a las células T CD4 específicas, mientras que los animales inmunizados con NYVAC experimentaban una inducción opuesta (Mooij et al, 2008). Estos resultados se deben en parte al patrón de expresión génica que activan MVA y NYVAC en los momentos tempranos de la infección, ya que la magnitud y temporalidad de la expresión se relaciona con la predisposición a desarrollar una u otra respuesta celular (Obst et al, 2005).

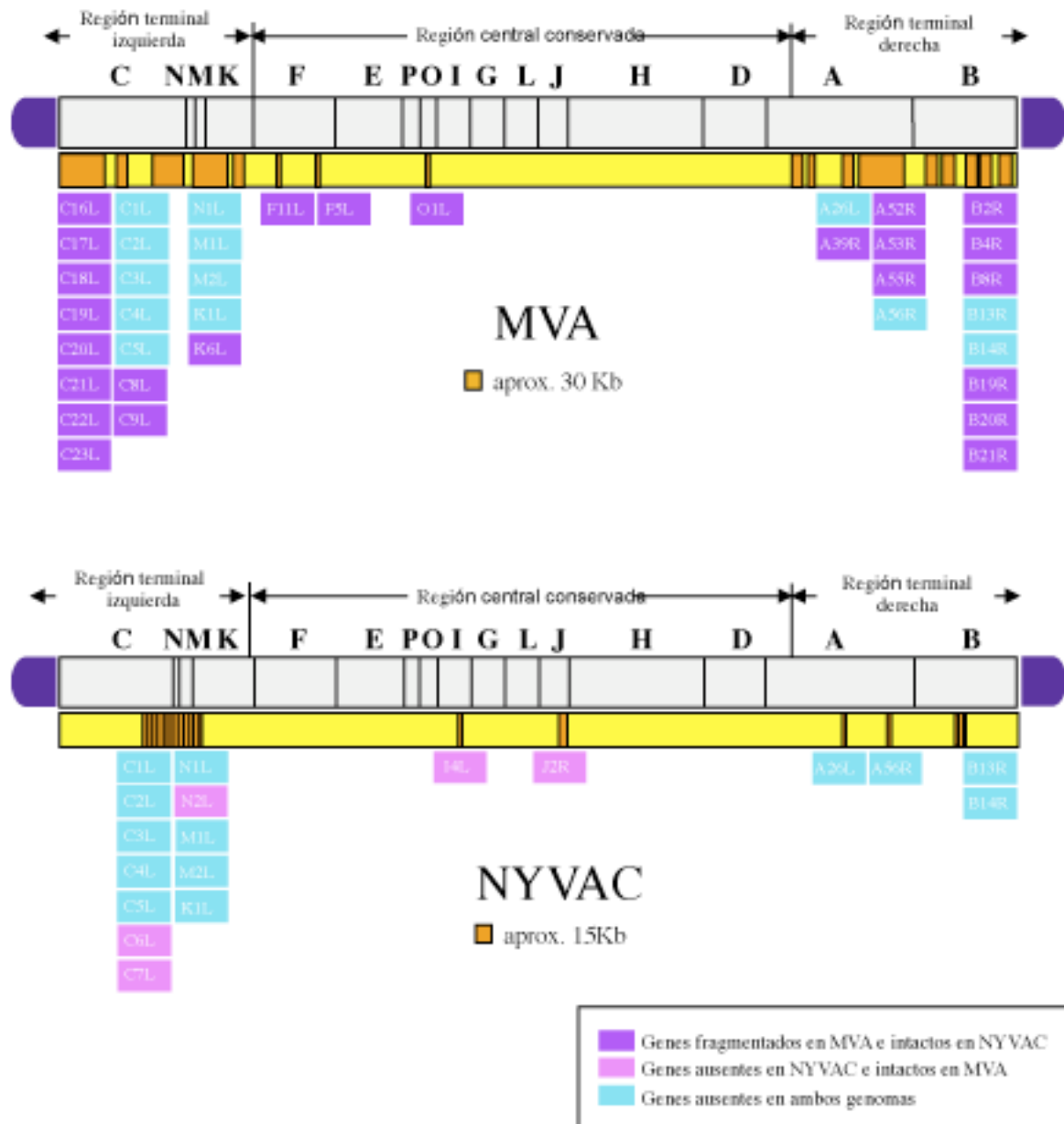


Figura 5: Esquema de los genes deletados en los genomas de MVA y NYVAC. Figura adaptada de Gómez, 2011.

Todas estas características hacen de los virus atenuados MVA y NYVAC unos candidatos vacunales eficiente y seguros y por ello, en la actualidad, se emplean como vectores vacunales frente a diversas enfermedades prevalentes (Gomez et al, 2011a) como la leishmaniasis (Perez-Jimenez et al, 2006), (Sanchez-Sampedro et al, 2012), cáncer de próstata (Krupa et al, 2011), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Gomez et al, 2011b).

5) El virus vaccinia y su hospedador.

Los poxvirus han coevolucionado con su hospedador de manera que son capaces de contrarrestar eficientemente la respuesta inmune generada regulando tanto el medio extracelular como el intracelular de la célula infectada. Debido a esto, la capacidad de un poxvirus determinado para llevar a cabo una infección productiva en un tipo celular específico depende de la capacidad de dicho poxvirus para bloquear los mecanismos antivirales del hospedador una vez que ha entrado en la célula. En este sentido, se sabe que VACV codifica un amplio abanico de proteínas implicadas en el control de la apoptosis, diferenciación celular, rango de hospedador, respuesta inmune y cascadas de señalización activadas por estrés (Taylor et al, 2006), (Hou et al, 2012), (Sutter et al, 1994), (Beattie et al, 1996), (Garcia-Arriaza et al, 2011), (Najera et al, 2006), (Schweneker et al, 2012).

Actualmente se desconocen los mecanismos fundamentales que subyacen a las distintas especificidades de rango de hospedador que encontramos en el género de los poxvirus. Esto es debido, en parte, a la existencia de tres niveles de tropismo diferentes que determinan el tropismo final de un virus determinado: el nivel celular, el nivel de tejido y el nivel de hospedador (McFadden, 2005). El tropismo celular implica que la replicación de un virus en una determinada línea celular puede ser permisiva, semi-permisiva o abortiva. El tropismo a nivel de tejido está influenciado por el tropismo celular y por las respuestas antivirales específicas de tejido o de órgano. Por último, el tropismo a nivel de hospedador está relacionado con la patogénesis y los síntomas de enfermedad que se producen en el organismo infectado y está determinado por los dos niveles de tropismo anteriores y por la respuesta inmune del hospedador. A pesar de que muchos poxvirus son estrictos en cuanto al hospedador al que son capaces de infectar, esta especificidad puede variar sustancialmente de forma que células derivadas de hospedadores considerados no permisivos pueden ser infectadas *in vitro* de forma efectiva, como sucede en el caso del poxvirus específico de conejos myxoma el cual es capaz de infectar células tumorales humanas gracias al gen de rango de hospedador *M-T5* (Sypula, 2004). La delección de genes no conservados dentro del género de los poxvirus ha proporcionado datos importantes acerca del rango de hospedador (Johnston & McFadden, 2004). En el caso concreto de VACV, los genes implicados en

determinar el rango de hospedador hasta el momento son los genes tempranos *B5R*, *E3L*, *K1L*, *K3L* y *C7L* (Werden et al, 2008).

Del mismo modo, con el objetivo de producir y propagar su progenie viral, VACV es capaz de modular determinadas rutas de señalización del hospedador (Perdiguero & Esteban, 2009), (Soares et al, 2009). La fosforilación es un mecanismo muy conservado por el cual la célula regula la activación o represión de la función de numerosas proteínas implicadas en diferentes procesos biológicos (Guan, 1994). Por ejemplo, se sabe que la activación transitoria de la quinasa regulada extracelularmente (ERK) y de la quinasa de c-jun (JNK), es un evento importante en el proceso de supervivencia celular. Debido a esto, existen numerosos ejemplos de virus que durante su evolución han desarrollado estrategias para regular estas proteínas (Renukaradhya et al, 2008), (Medders et al, 2010), (Huang et al, 2011b). De este forma, VACV no sólo es capaz de codificar su propias quinasas y fosfatasa (Lin et al, 1992), (Punjabi & Traktman, 2005), (Liu & Lin, 2005), sino que también es capaz de beneficiarse de la actividad de quinasas y fosfatasa celulares como p38MAPK, ERK y JNK que pertenecen a la familia de las quinasas activadas por mitógeno (MAPKs). Algunos autores ya han descrito la necesidad de VACV de mantener una correcta activación de ERK para obtener una producción viral eficiente (Andrade et al, 2004).

6) MAPKs: Características principales y regulación.

Las MAPKs son serín-/treonin-quinasas encargadas de transmitir estímulos extracelulares y desencadenar un amplio rango de respuestas celulares en respuesta a dichos estímulos. Esta familia de quinasas se encuentra muy conservada en el reino animal y sus distintos miembros desempeñan un papel importante tanto en condiciones biológicas basales como en situaciones patológicas. Entre las respuestas celulares que regulan se encuentran proliferación, diferenciación celular, estrés, inflamación, regulación del ciclo celular y apoptosis (Chambard et al, 2007), (Liu & Lin, 2005), (Cuenda & Rousseau, 2007).

Estas quinasas se dividen en MAPKs convencionales y MAPKs atípicas, en base a su habilidad de ser fosforiladas y, por tanto, activadas por miembros de la familia las MAP quinasa quinasa (MAPKK) (Coulombe & Meloche, 2007). En el presente trabajo nos hemos centrado en el estudio de tres de las MAPKs que forman parte de las MAPKs convencionales, dentro de las cuales se han identificado cuatro ramas nombradas de acuerdo con su MAPK correspondiente: la ruta de ERK1/2 (Boulton et al, 1991), la de JNK1-3 (Ip & Davis, 1998), la de p38MAPK α - δ (Cuenda & Rousseau, 2007) y la de ERK5 (Nithianandarajah-Jones et al, 2012). La cascada de ERK1/2 participa principalmente en proliferación y diferenciación celular mientras que las cascadas de JNK y p38MAPK están implicadas en respuesta a estrés celular

(Karin, 1998). La cascada gobernada por ERK5 responde a ambos tipos de estímulos. No obstante, dependiendo del tipo celular y de las condiciones de estimulación, las MAPKs pueden intercambiar sus funciones (Bacus et al, 2001).

La cascada de señalización de las MAPKs está integrada por más de 200 componentes distintos y funciona mediante la fosforilación y activación secuencial de sus componentes (Cargnello & Roux, 2011) En la Fig.6 se muestra un esquema de la ruta de señalización de las MAPKs. En primer lugar, se encuentran las MAPKKKs que son serín-/treonín-quinazas activadas por fosforilación a través de proteínas pequeñas de unión a GTP de la familia Ras/Rho o de proteínas adaptadoras. La activación de las MAPKKKs produce a su vez la fosforilación de las MAPKKs en el motivo común conservado Ser-Xaa-Ala-Xaa-Ser/Thr (Yan & Templeton, 1994). A continuación, las MAPKKs activan a las MAPKs mediante la fosforilación de los residuos localizados en el motivo Treonina-X-Tirosina, donde X es glicina en p38MAPK, glutamina en ERK y prolina en JNK (Marshall, 1994). Finalmente, las MAPKs actúan sobre diversas dianas tanto citoplasmáticas como nucleares entre las que se encuentran factores de transcripción y proteínas de la familia de las quinasas activadas por MAPK (MAPKAPK) (Gaestel, 2008). A modo de ejemplo, cabe destacar que ERK1/2 fosforilan a más de 160 sustratos (Yoon & Seger, 2006). Las MAPKAPKs, a su vez, presentan un amplio rango de sustratos de manera que la señal transmitida por dicha ruta es amplificada de una manera muy eficiente.

La regulación de la expresión génica celular mediada por MAPKs se realiza principalmente a través de la fosforilación de otras quinasas y de factores de transcripción, pero las MAPKs también desempeñan esta función mediante el control del transporte, la estabilidad y la traducción de determinados ARNm (Dong et al, 2002), mediante la modificación de la estructura de la cromatina (Cheung et al, 2000) o mediante la modificación de la estabilidad de determinadas proteínas.

La especificidad de las MAPKs se obtiene por una serie de mecanismos diferentes como la regulación de la magnitud y duración de la señal, la interacción de las MAPKs con proteínas de anclaje que las unen a sus moléculas activadoras o a sus sustratos, la interacción entre diferentes ramas de las MAPKs o de las MAPKs con otras rutas de señalización celular, la distinta localización subcelular y la presencia de numerosos componentes específicos en cada nivel de la cascada de señalización.

Con el objetivo de mantener un equilibrio en la señalización por MAPKs para proporcionar una respuesta eficiente, es necesario un control exhaustivo de la magnitud y la duración de la activación de estas quinasas (Murphy & Blenis, 2006), (Marshall, 1995), lo que

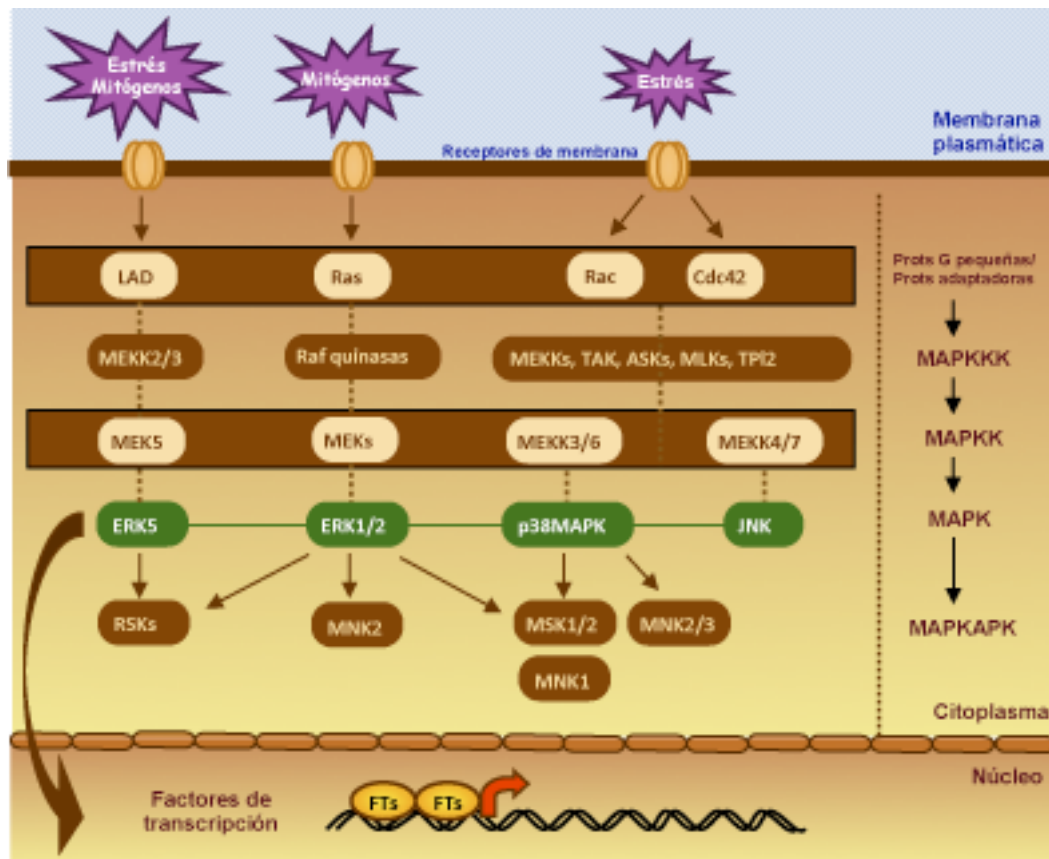


Figura 6: Esquema de la ruta de señalización de las MAPKs Figura adaptada de Keshet y Seger, 2010.

se consigue principalmente mediante la eliminación de los residuos fosfato responsables de la activación de las MAPKs. Entre las proteínas encargadas de este proceso se encuentran las tirosín-fosfatasas, las serín-/treonín-fosfatasas o las treonín-/tirosín-fosfatasas. Estas últimas se denominan fosfatasas de especificidad dual (DUSPs) y proporcionan un mecanismo de coordinación de la ruta de las MAPKs muy importante para la célula (Caunt & Keyse, 2012), no sólo por la defosforilación que llevan a cabo sobre las MAPKs, sino porque también sirven de anclaje para éstas permitiendo su correcta localización subcelular (Mandl et al, 2005). La expresión dinámica de las DUSPs junto con su especificidad de sustrato y su compartimentalización subcelular convierten a estas fosfatasas en reguladores óptimos de la duración de la activación de las MAPKs, más allá de un simple mecanismo de interruptor celular.

La familia de las DUSPs comparte un motivo de interacción con quinasa (KIM, del inglés “Kinase interacting motif”) localizado en el dominio N-terminal que consta de dos o tres residuos de arginina y una región catalítica situada en el extremo C-terminal. El hecho de que varios miembros de la familia puedan unirse a una misma MAPK hizo pensar que estas

fosfatasa podrían tener una función redundante lo que retrasó en parte su estudio en profundidad. No fue hasta la generación de ratones KO para cada fosfatasa cuando el interés en estas aumentó, especialmente en su implicación en la respuesta inmunológica (Salojin & Oravecz, 2007). En la actualidad ha sido ampliamente descrita la versatilidad funcional de las DUSPs ya que son capaces de unirse tanto a las formas fosforiladas como a las no fosforiladas de las MAPKs proporcionando un mecanismo adicional para regular la actividad de estas MAPKs que a su vez, desempeñan funciones que no requieren su actividad catalítica (Rauch et al, 2011).

7) Fosfatasa de especificidad dual 1 (DUSP1).

DUSP1 es el miembro más representativo de la familia de las DUSPs y, por tanto, ha sido extensamente estudiado. Fue descrito por primera vez en 1985 como uno de los genes que se expresaba en células murinas en cultivo durante la transición G₀/G₁ {Lau, 1985 #135}. Sin embargo, la observación de que los primeros ratones DUSP1 knock-out (KO) generados eran capaces de crecer, reproducirse con normalidad y no presentaban ningún fenotipo relacionado con la desregulación de la actividad de las MAPKs {Dorfman, 1996 #41}, hizo que no fuera hasta la última década cuando se publicaran estudios relevantes sobre la función de DUSP1 en diversos procesos celulares. En la actualidad, se ha descrito que DUSP1 está implicado en multitud de procesos tales como apoptosis (Li et al, 2011), (Takeuchi et al, 2009), cáncer (Bermudez et al, 2010), (Boutros et al, 2008b), trasplantes (Boutros et al, 2008b), artritis (Vattakuzhi et al, 2012), asma (Manetsch et al, 2012), depresión (Duric et al, 2010), metabolismo y obesidad (Sakaue et al, 2004), (Wu et al, 2006), reparación de tejidos (Perdiguerio et al, 2012) e inflamación (Wang & Liu, 2007).

DUSP1 pertenece a la subfamilia de las DUSPs nucleares que está formada por las fosfatasas DUSP1, DUSP2, DUSP4 y DUSP5. Todas ellas se expresan a niveles basales y aumentan su expresión rápida y exponencialmente en respuesta al estímulo. Recientemente, algunos estudios proponen que la actividad de DUSP1 no está restringida exclusivamente al núcleo de la célula ía. El gen *dusp1*, representado en la Fig.7A, es un gen de respuesta inmediata-temprana que contiene cuatro exones y tres intrones y que codifica un ARNm de aproximadamente 2.4 Kb cuyos niveles aumentan entre 10 y 100 veces en un intervalo de tiempo que oscila entre 15 y 60 min tras la estimulación. Su promotor posee secuencias consenso de unión a diferentes moléculas transactivadoras como p53 (Li et al, 2003) o NFκB (Wang et al, 2008). Los niveles de ARNm de DUSP1 se regulan mediante la estabilidad de la molécula, la síntesis *de novo* y la elongación (Boutros et al, 2008a), (Kuwano & Gorospe, 2008). La proteína DUSP1 tiene una vida media de entre 40 min y 2 horas y presenta una

serie de elementos reguladores (Fig.7B). En su extremo N-terminal se localiza el motivo LXXLL que actúa como secuencia de localización nuclear (Wu et al, 2005); A continuación se encuentra uno de los dos dominios de homología a cdc25 (CH2-A), seguido del motivo KIM (KBD) y del otro dominio de homología a cdc25 (CH2-B). Entre los aminoácidos 2 y 137 está localizado el dominio rodanasa, implicado en reacciones de transferencia de grupos sulfuro y que en el caso de DUSP1 carece de la cisteína crítica para realizar dicha función catalítica (Bordo & Bork, 2002). Cerca del extremo C-terminal se encuentra el dominio fosfatasa que contiene el motivo (I/V)HCXAGXXR(S/T)SG cuya cisteína 258 es crítica para la función catalítica, y que se activa funcionalmente tras el cambio conformacional que sufre la proteína al unirse a sus ligandos (Owens & Keyse, 2007). Finalmente, se encuentran las serinas 296 y 323 responsables de la degradación proteosómica de la proteína y las serinas 359 y 364 encargadas de la estabilización de la misma. Ambos grupos de serinas son fosforilados por la quinasa celular ERK como mecanismo de regulación de la ruta de las MAPKs (Lin & Yang, 2006). Asimismo, el residuo lisina 57 en el extremo N-terminal es susceptible de ser acetilado, lo que produce importantes efectos en la respuesta inmune inflamatoria del hospedador (Cao et al, 2008), (Chi & Flavell, 2008).

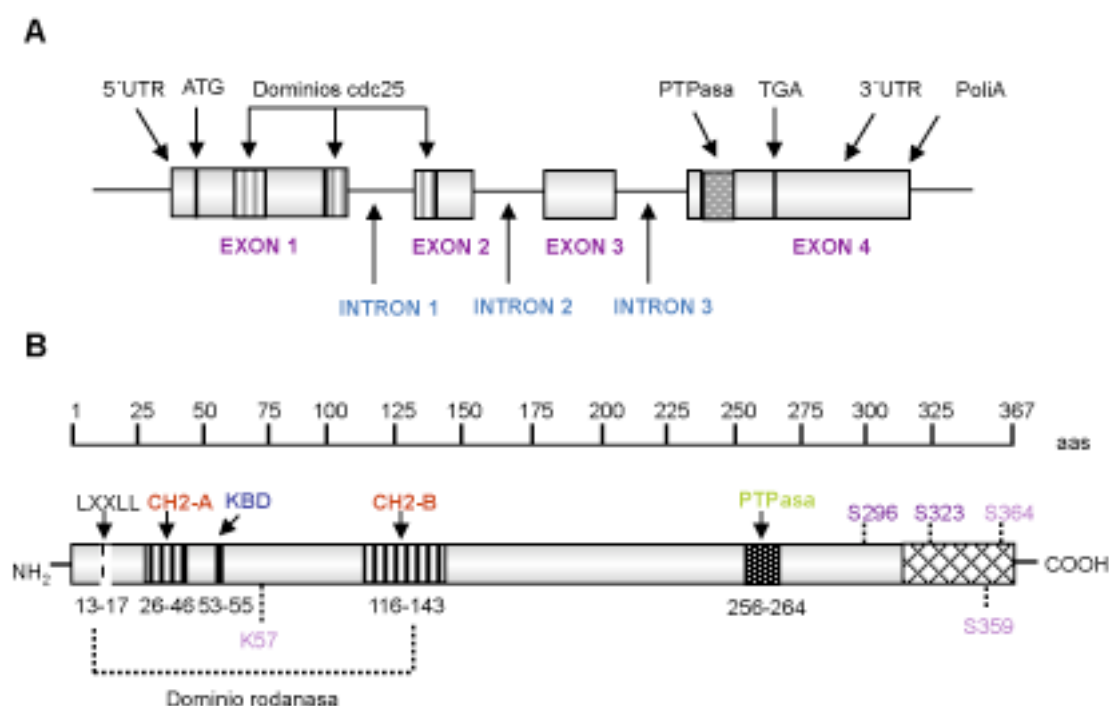


Figura 7: Esquema del gen y la proteína de DUSP1. A) Gen *dusp1*. B) Proteína DUSP1. Figura adaptada de Boutros, 2008.

DUSP1 se expresa de forma ubicua en el organismo y su expresión se encuentra fuertemente aumentada en respuesta a distintos estímulos como estrés oxidativo, hipoxia, factores de crecimiento, glucocorticoides, shock por calor y luz ultravioleta {Liu, 2008 #70}, {Shields, 2011 #80}, {Lasa, 2010 #136}, {Lee, 2005 #21}, {Franklin, 1998 #26}. Las MAPKs juegan un papel importante en la inducción de DUSP1. La contribución específica de cada una de ellas depende del tipo de estimulación y del contexto celular. Por ejemplo, la inducción de DUSP1 en fibroblastos murinos NIH-3T3 se produce a través de la activación de JNK (Bokemeyer et al, 1996). Sin embargo, en fibroblastos murinos C3H10T/2 el aumento de expresión de DUSP1 está mediado por ERK en respuesta a estrés por calor y estrés oxidativo y por p38MAPK en respuesta a luz ultravioleta (Li et al, 2001). En algunos casos es necesaria la acción sinérgica de las tres ramas de las MAPKs para la inducción de DUSP1, como sucede en la estimulación de macrófagos con LPS (Chen et al, 2002), (Sanchez-Tillo et al, 2007). Un estudio publicado en 2006 sobre la regulación de la respuesta inmune innata mediada por MAPKs demostró que DUSP1 se induce a través de la ruta de los TLR como mecanismo de autoregulación negativa de la ruta. El aumento de expresión de DUSP1 depende de las moléculas adaptadoras MyD88 o TRIF, según el tipo de estímulo que reciba la célula. En el caso de la señalización mediada por TLR3, implicado en el reconocimiento de señales virales, la inducción de DUSP1 se lleva a cabo a través de TRIF (Chi et al, 2006). DUSP1 es capaz de unirse a p38MAPK, JNK o ERK, en este orden de preferencia (Franklin & Kraft, 1997), dependiendo del estado celular {Slack, 2001 #37}, {Owens, 2007 #5}. La unión de DUSP1 a sus sustratos es específica y se ha demostrado que la secuencia de unión a JNK (motivo LXL) difiere de la secuencia de unión a ERK y p38MAPK, siendo los residuos de arginina 53-55 esenciales en esta última (Slack et al, 2001).

El modelo de ratón ha contribuido sustancialmente a entender la función de DUSP1 en la respuesta inmune del hospedador. El primer modelo de ratón knock-out (KO) para DUSP1 fue generado y caracterizado en 1996 (Dorfman et al, 1996). En este estudio los autores observaron que los ratones KO no presentaban deficiencias en el desarrollo ni en la capacidad de reproducción ni ninguna anomalía en los órganos vitales. Posteriormente, varios grupos analizaron el comportamiento de estos ratones DUSP1 KO tras la estimulación con LPS y observaron que dichos animales sufrían un aumento en la tasa de mortalidad, presentaban unos niveles elevados de las citoquinas TNF- α , IL-6, IFN- γ e IL-10 y de las quimioquinas CCL3, CCL4 y CCLX2, un patrón claro de inflamación pulmonar con presencia de edemas e infiltración de células del sistema inmune, un aumento de los niveles de nitratos en sangre e hipotensión (Salojin et al, 2006), (Hammer et al, 2006).

A partir de ese momento, debido al importante papel desempeñado por p38MAPK y JNK en la regulación de la síntesis de citoquinas (Huang et al, 2009), (Dong et al, 2002),

(Rincon & Pedraza-Alva, 2003) y a la preferencia de sustrato que presenta DUSP1 por estas dos quinasas, se realizaron numerosos estudios con el objetivo de analizar en profundidad la función de DUSP1 en el control de la producción de citoquinas. Utilizando macrófagos primarios e inmortalizados procedentes de ratones DUSP1 WT o KO se obtuvieron una serie de resultados claros. Se observó aumento de la expresión de DUSP1 en respuesta a LPS de una manera dosis-dependiente y, en ausencia de DUSP1, una activación más prolongada de p38MAPK y JNK y un aumento sustancial en la producción de diversas citoquinas proinflamatorias tras la estimulación con LPS (Zhao et al, 2005), (Chi et al, 2006). Posteriormente, se demostró que DUSP1 era responsable de la regulación de 608 genes modulados específicamente por LPS, relacionados mayoritariamente con inflamación (Hammer et al, 2006). Desde entonces, se han publicado numerosos trabajos que demuestran la implicación de DUSP1 en la respuesta inmune innata del hospedador frente a diversos estímulos (Liu et al, 2007), (Wang & Liu, 2007), (Wancket et al, 2011).

Sin embargo, pocos estudios han profundizado en el papel de DUSP1 en la respuesta inmune adaptativa del hospedador. Se ha descrito que las células T deficientes en DUSP1 presentan una producción de citoquinas alterada y una proliferación reducida a causa de la menor translocación al núcleo del factor de transcripción NFATc (Zhang et al, 2009). No obstante, debido a que la diferenciación de las células T está en parte influenciada por la respuesta inmune innata, aún no está claro si los defectos que presentan los ratones DUSP1 KO son debidos a la desregulación de la respuesta inmune innata, de la adaptativa o de ambas. Recientemente, se ha demostrado que la ruta de señalización mediada por DUSP1-p38MAPK es responsable de la integración de las diversas señales recibidas por las células dendríticas mediante el control de la producción de las citoquinas IL-6, IL-12 y TGF- β 2 con el fin de determinar la diferenciación entre linfocitos Th1, Th17 o linfocitos T reguladores (Huang et al, 2011a). Los ensayos realizados por este grupo con ratones DUSP1 KO muestran el importante papel que desempeña DUSP1 en la integración de las respuestas inmunes innata y adaptativa del hospedador.

Debido a los numerosos estudios que relacionan a DUSP1 con la regulación de diferentes procesos biológicos en el organismo y, en concreto, con el sistema inmune del hospedador, muchos autores han profundizado en el papel de DUSP1 en la infección por diferentes patógenos como las bacterias Gram positivas *Listeria monocytogenes* (Schwan et al, 1996), (Kugler et al, 1997) y *Staphylococcus aureus* (Kugler et al, 1997), las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* (Frazier et al, 2009) y *Chlamydomphila pneumoniae* (Rodriguez et al, 2010) y los parásitos *Leishmania donovani* (Kar et al, 2010), *Leishmania major* (Srivastava et al, 2011) y helmintos (Klotz et al, 2011). En la mayoría de estos casos, DUSP1 modula la respuesta inflamatoria desencadenada por estos patógenos de forma que en ausencia de

DUSP1, se produce una inflamación exacerbada y un aumento de la susceptibilidad de los animales frente a las infecciones con dichos patógenos, independientemente de si se produce o no un aumento en la carga bacteriana o parasitaria en el organismo infectado (Hammer et al, 2010), (Frazier et al, 2009).

Sin embargo, solamente existen tres trabajos sobre el papel de DUSP1 durante las infecciones virales. El primero de ellos se publicó en 2008 y demuestra que los ratones DUSP1 KO eliminan el virus Influenza del organismo más lentamente que los ratones DUSP1 WT y presentan una menor respuesta T CD8 y CD4 antígeno-específica (Zhang et al, 2009). Posteriormente, se ha descrito que el coronavirus responsable de la bronquitis es capaz de contrarrestar la inducción de las citoquinas IL-6 e IL-8, mediada por p38MAPK, a través de la inducción de DUSP1 (Liao et al, 2011). Finalmente, a comienzos de 2013, se ha descrito que el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi inhibe la inducción transcripcional de DUSP1 con el objetivo de mantener la expresión de genes virales durante la latencia (dependiente de ERK) e inducir la producción de factores implicados en migración e invasión celular (Qin et al, 2013).

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

El virus vaccinia se emplea en la actualidad como vector vacunal frente a diversas enfermedades prevalentes; es por ello que se necesita un conocimiento exhaustivo de la interacción del virus con el hospedador.

A partir de datos previos de nuestro laboratorio obtenidos mediante análisis por microarrays que demuestran que la fosfatasa celular DUSP1 es uno de los genes que se inducen de forma específica durante la infección por el virus vaccinia y considerando el papel que desempeña DUSP1 en la respuesta inmune del hospedador, en el presente trabajo nos propusimos analizar la función de DUSP1 durante la infección por el virus vaccinia salvaje WR o los virus atenuados MVA y NYVAC.

1. Análisis de la inducción de DUSP1 durante la infección por el virus vaccinia.
2. Análisis de la replicación del virus vaccinia en células murinas en cultivo.
3. Análisis de la patogenia y la replicación del virus vaccinia en el modelo *in vivo* de ratón.
4. Análisis de las respuestas inmunes antiviral innata y adaptativa del hospedador.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1) Materiales biológicos

1.1) Células.

1.1.1) Líneas celulares

A continuación se detallan las líneas celulares utilizadas a lo largo de este estudio.

BSC40: células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

BHK21: fibroblastos de riñón de hámster dorado (*Mesocricetus auratus*).

DF1: fibroblastos embrionarios de pollo (*Gallus gallus*) inmortalizados espontáneamente.

HeLa: células epiteliales procedentes de un carcinoma humano de cuello de útero.

1.1.2) Medios de cultivo

Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C en un incubador con un porcentaje de CO₂ del 5%.

Las líneas celulares BHK21, DF1, HeLa y los fibroblastos salvajes y carentes de DUSP1 se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal de ternera (FCS; Sigma), penicilina (100 U/ml; SIGMA), estreptomycin (100 µg/ml; SIGMA), L-glutamina (2 mM; Merck), aminoácidos no esenciales (SIGMA) y gentamicina (Gibco). La línea celular BSC40 se cultivó en el mismo medio pero suplementado con un 10% de suero de ternera recién nacida (NCS; Sigma).

Para el cultivo de los macrófagos del peritoneo o de los esplenocitos murinos se utilizó medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10% de FCS, penicilina, estreptomycin, L-glutamina (Merck), HEPES pH 7,4 (10 mM; Sigma) y β-Mercaptoetanol (10 µM; Sigma).

1.1.3) Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)

Los cultivos embrionarios de ratón se obtuvieron a partir de embriones de 14,5 días de gestación procedentes de nuestras colonias de ratones DUSP1 WT o KO residentes en el animalario del Centro Nacional de Biotecnología. Todo el procedimiento se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar. Las ratonas preñadas fueron sacrificadas y se extrajo el útero completo. Tras varios lavados con PBS en un tubo de 50 ml, los embriones fueron extraídos uno a uno y se dispusieron en una placa Petri en 10 ml de PBS. Posteriormente se extrajeron el cerebro, el corazón y el hígado de cada embrión y se desecharon. El material restante fue lavado de nuevo en 10 ml de PBS e incubado con tripsina durante la noche a 4°C para ser sometido al día siguiente a un nuevo proceso de tripsinización, esta vez durante 30 min a

37°C. Tras varios lavados con PBS, los fibroblastos primarios obtenidos se cultivaron en 5 placas p100 durante 24 horas (pase 1). Al día siguiente, se añadió medio fresco y se cultivaron los fibroblastos hasta alcanzar la subconfluencia (aprox. 3 días). A continuación sometimos a los fibroblastos a un pase 1:5 y los cultivamos hasta alcanzar la confluencia (pase 2). Por último, contamos las células y sembramos 5 placas p100 con $3,8 \times 10^5$ células/p100 (pase 3) y las cultivamos durante 3 días. Entre los pases 3 y 5 los fibroblastos embrionarios crecieron a un ritmo normal. Sin embargo, entre los pases 5 y 14 el cultivo experimentó un crecimiento lento debido a la muerte de gran parte de las células. Sólo aquellas que fueron capaces de acumular un número suficiente de mutaciones que les permitieran crecer exponencialmente constituyeron el cultivo madre de fibroblastos murinos inmortalizados que de esta forma comenzó a crecer con normalidad a partir del pase 20.

1.1.4) Obtención de esplenocitos.

Los bazos de ratones sacrificados 10 días después de la infección viral se recogieron en medio RPMI + 10% FCS y se mantuvieron en hielo durante todo el proceso de extracción celular. Primero se homogenizaron con un separador celular de 40 μ M y, a continuación, las células obtenidas se lavaron con medio RPMI mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. Con el objetivo de eliminar los eritrocitos contaminantes, el cultivo se sometió a un tratamiento con NH_4Cl 0,1 M (2 ml/bazo) durante 5 min a 4°C. Posteriormente, las células se lavaron de nuevo con medio RPMI 3 veces y se eliminaron los residuos de tejido graso con una pipeta Pasteur de vidrio. Finalmente, las células se resuspendieron en 5 ml de medio completo y se contó el número de células obtenidas mediante tinción con azul Tripán (4% en agua; SIGMA). Esta tinción nos determinó la viabilidad celular. Los esplenocitos obtenidos de fueron utilizados para realizar el análisis mediante marcaje intracelular de citoquinas (ICS).

1.2) Virus.

A continuación se describen los virus utilizados en este trabajo:

WR: Virus vaccinia salvaje de la cepa *Western Reserve*, cedida por el Dr. Rostov Bablanian de la Universidad estatal de Nueva York (USA).

MVA: Virus Modificado de *Ankara*, cedida por el Dr. Gerd Sutter del Instituto de Microbiología Médica de Munich (Alemania).

NYVAC: Virus vaccinia atenuado procedente de la cepa *Copenhagen*, cedida por la empresa Sanofi-Pasteur (Francia).

Además, se utilizaron los virus recombinantes **WR-luc**, **MVA-luc** y **NYVAC-luc** que

expresan la proteína luciferasa insertada en el locus de la timidin-kinasa (TK) y que han sido previamente descritos {Rodriguez, 1988 #163}, {Ramirez, 2000 #164}, {Gomez, 2007 #165}, respectivamente.

2) Reactivos.

2.1) Anticuerpos.

En la [tabla II](#) aparecen detallados los anticuerpos utilizados en este trabajo junto con su descripción, procedencia y dilucion empleada según la tecnica utilizada.

2.2) Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados en los análisis por PCR para el genotipado de los cultivos y de los ratones DUSP1 WT y KO fueron los siguientes:

E2	5'- GAGGATATGAAGCGTTTTTCGG - 3'	Directo
PGKT1	5'- CCAGCTCATTCTCCACTCATG - 3'	Directo
W3REV	5'- CCTGGCACAATCCTCCTAGAC - 3'	Inverso

2.3) Péptidos.

El péptido específico para el virus vaccinia utilizado en los ensayos de ELISPOT e ICS corresponde a la proteína temprana de VACV E3 (generado en el CNB), se utiliza a un concentración final de 10 µg/ml y tiene la siguiente secuencia: VGPSNSPTF.

2.4) Tampones.

PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂PO₄ 8 mM y KH₂PO₄ 1,5 mM.

Tampón de carga Laemmli: Tris-HCL 50 mM pH 6,8, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,012%.

Tampón de electroforesis para SDS-PAGE (Tris-glicina SDS): Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%.

Tampón de fijación (microscopía electrónica): Paraformaldehído al 4% + glutaraldehído al 2% en tampón NaH₂PO₄ /Na₂ HPO₄ 0.1M pH 7.4.

Tampón ICS: PBS + 2% FCS.

Tampón carbonato (0,1 M pH 9,6): Na₂CO₃ 0,1 M y NaHCO₃ 0,1 M.

TBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 y 150 mM NaCl.

Tampón de carga de ADN: Xylen-cyanol 0,25%, glicerol 30% y azul de bromofenol 0,25%.

TBE: 90 mM Tris, 190 mM Glicina y 0,1% SDS.

ANTICUERPO	CARACTERÍSTICAS	PROCEDENCIA	DILUCIÓN
Anticuerpos primarios frente a proteínas del virus vaccinia			
α A4	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína de 39 KDa de VACV A4	Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid	1: 1.000 (WB)
α A10 (62K)	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína procesada de 62 KDa de VACV A10	Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid	1: 1.000 (WB)
α A17	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína de 25 KDa de VACV A17	Rodriguez y cols, 1995	1: 1.000 (IF)
α A17 (N-terminal)	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la región N-terminal de la proteína de VACV A17	Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid	1: 1.000 (WB)
α A27	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína de 14 KDa de VACV A27	Dallo y Esteban, 1987	1: 1.000 (WB)
α A27	Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína de 14 KDa de VACV A27	Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid	1: 2.000 (IF)
α E3	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína de 25 KDa de VACV E3	Cedido por el Dr. B. Jacobs (ASU, Arizona)	1: 1.000 (WB)
α L4	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína de 25 KDa de VACV L4	Cedido por el Dr. D. Hruby (CGRB, Oregon)	1: 1.000 (WB)
α WR	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteínas de la cepa WR de VACV	Denkowicz y cols, 1992	1: 1.000 (WB)

Tabla II: Anticuerpos utilizados en este trabajo. WB: Western-blot, IF: Inmunofluorescencia, ICS: Intracellular cytokine staining.

ANTICUERPO	CARACTERÍSTICAS	PROCEDENCIA	DILUCIÓN
Anticuerpos primarios frente a proteínas celulares			
α ERK	Anticuerpo policlonal de conejo frente a las proteínas ERK1 (44 KDa) y ERK2 (42 KDa)	Cell Signaling	1: 1.000 (WB)
α P-ERK	Anticuerpo policlonal de conejo frente a las proteínas fosforiladas ERK1 y 2 (Thr202/Tyr204) de 44 y 42Kda, respectivamente	Cell Signaling	1: 1.000 (WB)
α JNK	Anticuerpo policlonal de conejo frente a las proteínas de 46 y 54 KDa de JNK1/2	Cell Signaling	1: 500 (WB)
α P-JNK	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína fosforilada (Thr183/Tyr185) de 46 y 54 KDa JNK	Cell Signaling	1: 1.000 (WB)
α p38MAPK	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína de 43 KDa p38MAPK	Cell Signaling	1: 1.000 (WB)
α P-p38MAPK	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína fosforilada (Thr180/Tyr182) de 43 KDa p38MAPK	Cell Signaling	1: 1.000 (WB)
α DUSP1	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína de 40 KDa DUSP1	Santa Cruz Biotech, CA.	1: 1.000 (WB)
α P-DUSP1	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína fosforilada (Ser359) de 40 KDa DUSP1	Cell Signaling	1: 1.000 (WB)
α Tubulina-α	Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína de 55 KDa Tubulina	Cell Signaling	1: 2.000 (WB)

Tabla II (continuación): Anticuerpos utilizados en este trabajo. WB: Western-blot, IF: Inmunofluorescencia, ICS: Intracellular cytokine staining.

2.5) Otros reactivos.

Brefeldina A: γ,4-Dihidroxi-2-(6-hidroxi-1-heptenil) - 4 - ácido ciclopentanecrotonico λ-lactona contenido en el kit Golgiplug (BD Biosciences).

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI): Agente intercalante de ácidos nucleicos (1:200;

SIGMA).

Faloidina-TRITC: Faloidina-tetrametilrodamina B isocianato (1:500. SIGMA).

Inhibidor de ERK: 1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis-2[aminofeniltio] butadieno (Calbiochem).

Inhibidor de p38MAPK: 4-(4-Fluorofenil)-2-(4-metilsulfinilfenil)-5-(4-piridil)1H-imidazol (Merck).

Mezcla de activación: Contiene Forbol 12-Miristato 13-Acetato (Mooij et al), ionomicina y brefeldina A.

Violet Dye: LIVE/DEAD Fixable Violet Dead Cell Satin Kit (Invitrogen).

3) Métodos.

3.1) Manipulación de ADN.

3.1.1) *Purificación de ADN celular.*

El ADN total procedente de diferentes cultivos o de tejido de la cola de ratones fue aislado utilizando el kit comercial *DNeasy Blood and Tissue Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado el ADN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, EEUU) y se guardó a -20° C hasta su uso.

3.1.2) *Amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).*

La reacción de PCR para amplificar el gen DUSP1 se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl utilizando *PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads* (GealthCare) y añadiendo 200 µM de cada oligonucleotido (apartado 2.2) y 100 ng de ADN molde. Se empleó un termociclador *Verita 96 well Therm Cycler* (Applied Biosystems) y se utilizó el siguiente programa de amplificación: un ciclo inicial de 5 min a 95°C seguidos de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 50°C y 1 min a 72°C, para terminar con una extensión final de 7 min a 72°C.

3.1.3) *Electroforesis en geles de agarosa.*

La separación de ADN se realizó utilizando geles de agarosa (Pronadisa, CONDA) al 1% en TBE.

ANTICUERPO	CARACTERÍSTICAS	PROCEDENCIA	DILUCIÓN
Anticuerpos conjugados			
α IgG de ratón-HRP	Anticuerpo policlonal de cabra frente a IgG murina conjugado con peroxidasa	SIGMA	1: 5.000 (WB)
α IgG de conejo-HRP	Anticuerpo policlonal de cabra frente a IgG de conejo conjugado con peroxidasa	SIGMA	1: 10.000 (WB)
α IgG-Alexa488	Anticuerpo policlonal de cabra frente a IgG de conejo conjugado con alexa488	Invitrogen	1: 500 (IF)
α IgG-Alexa594	Anticuerpo monoclonal de cabra frente a IgG de ratón conjugado con alexa594	Invitrogen	1: 500 (IF)
α CD3-FITC	Anticuerpo de rata frente a CD3 murino conjugado con isotiocianato de fluoresceína; clon RM4-5	BD Bioscience	1:100 (ICS)
α CD3-PerCP	Anticuerpo de hamster frente a CD3 murino conjugado con ficoertrina y peridina-clorofil-proteína	BD Bioscience	1:50 (ICS)
α CD4-Alexa700	Anticuerpo de rata frente a CD4 murino conjugado con Alexa700	BD Bioscience	1:100 (ICS)
α CD4-APCCy7	Anticuerpo de rata frente a CD4 murino conjugado con alofocianina y cianina 7	BD Bioscience	1:100 (ICS)
α CD8-PerCP	Anticuerpo de rata frente a CD8 murino conjugado con ficoertrina y peridina-clorofil-proteína	BD Bioscience	1:200 (ICS)
α CD8-V500	Anticuerpo de rata frente a CD8 murino conjugado con HorizonV500	BD Bioscience	1:100 (ICS)
α IL-2-PE	Anticuerpo de rata frente a IL-2 murino conjugado con ficoertrina	BD Bioscience	1:40 (ICS)
α IL-2-APC	Anticuerpo de rata frente a IL-2 murino conjugado con alofocianina	BD Bioscience	1:40 (ICS)
α IFN-γ-APC	Anticuerpo de rata frente a IFN-γ murino conjugado con alofocianina	BD Bioscience	1:50 (ICS)
α IFN-γ-PeCy7	Anticuerpo de rata frente a IFN-γ murino conjugado con ficoertrina-cianina 7	BD Bioscience	1: 50 (ICS)
α TNF-α-PeCy7	Anticuerpo de rata frente a TNF-α murino conjugado con ficoertrina-cianina 7	BD Bioscience	1:100 (ICS)
α TNF-α-PE	Anticuerpo de rata frente a TNF-α murino conjugado con ficoertrina	BD Bioscience	1:100 (ICS)

Tabla II (continuación): Anticuerpos utilizados en este trabajo. WB: Western-blot, IF: Inmunofluorescencia, ICS: Marcaje intracelular (del inglés “Intracellular cytokine staining”).

3.2) Manipulación de ARN.

3.2.1) Purificación de ARN celular.

El ARN total celular fue aislado utilizando el kit comercial *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificado el ARN se procedió a eliminar los posibles residuos contaminantes de ADN mediante el tratamiento con la enzima DNAsa I (Roche). Posteriormente, la cantidad de ARN obtenido se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, EEUU) y se guardó a -70° C hasta su uso.

3.2.2) Reacción de la Transcriptasa reversa.

La síntesis de ADNc o retro-transcripción se realizó utilizando la enzima comercial SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 1 µg de ARN se preincubó con una mezcla que contenía oligo(dT) y dNTPs durante 5 min a 64°C y 1 min a 4°C. A continuación, se realizó la incubación con la enzima retrotranscriptasa (200 U/reacción) en presencia del buffer correspondiente y de DTT. Por último, se llevó a cabo la inactivación de la enzima a 70°C durante 15 min. Una vez obtenido el ADNc, se eliminaron los posibles restos contaminantes de ARN mediante el kit comercial *MinElute PCR Purification Kit* (QIAGEN). El ADNc resultante se guardó a -20°C hasta su utilización.

3.2.3) Cuantificación relativa de ARN mediante PCR a tiempo real.

Para la reacción de PCR cuantitativa se utilizó el kit comercial *Taqman Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. La técnica está basada en la cuantificación de la fluorescencia emitida por la sonda específica del gen a analizar cuando ésta hibrida de forma específica con la secuencia diana. Brevemente, se utilizaron 20 ng de ADNc, sondas específicas para el gen DUSP1 y el buffer correspondiente hasta un volumen final de 25 µl. Los parámetros utilizados para la amplificación fueron los siguientes: 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Como control interno se utilizó una sonda específica para la hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 (HPRT1). Los datos fueron analizados mediante el programa *ABI PRISM 7000 SDS v.1.2.3.* (Applied Biosystems). Las muestras fueron ensayadas por triplicado. Se utilizaron los valores correspondientes a las medias de los ciclos de corte (C_t) de HPRT1, como control de gen endógeno para normalizar la cuantificación, y C_t de muestras sin infectar para cada tiempo analizado con el fin de obtener los valores de expresión relativos de DUSP1 en cada muestra ensayada.

3.3) Manipulación de proteínas.

3.3.1) Extracción de proteínas totales.

Para la obtención de muestras de proteína se recogieron los cultivos celulares infectados en PBS frío sobre una superficie a 4°C y se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm. A continuación, los pelet resultantes se resuspendieron en reactivo comercial *Cell Lysis Buffer 10X* (Cell Signaling Technology), que contiene inhibidores de proteasas y fosfatasa, y se incubaron a 4°C durante un periodo mínimo de 10 min. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 13.000 rpm y los sobrenadantes se guardaron a -70°C hasta su utilización.

La cantidad de proteína presente en los diferentes extractos fue cuantificada utilizando el kit comercial BCA (Pierce Biotechnology), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se ensayaron por duplicado. Tras la cuantificación, las muestras de proteína se mezclaron con el volumen adecuado de buffer de carga Laemmli.

3.3.2) Análisis de las proteínas mediante SDS-PAGE e inmunodetección (Western-blot).

Las muestras de proteína fueron analizadas mediante la técnica de electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). El porcentaje de acrilamida utilizado varió dependiendo del peso molecular (Mooij et al) de la proteína objeto de ensayo. Las proteínas fueron posteriormente transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia semi-seco en el que se utilizaron 3 soluciones: Tampón A (10,3 M Tris, 20% metanol), tampón B (25 mM Tris, 20% metanol) y tampón C (25 mM Tris, 20% metanol y 40 mM ácido 6-ε-amino-n-caproico). La transferencia de las proteínas del soporte gel al soporte membrana se llevó a cabo utilizando papeles Whatman-3MM embebidos previamente en los tampones descritos. La corriente empleada fue de 200 mA durante 45-55 min. Una vez finalizada la transferencia, se embebió la membrana en una solución de tinción con rojo Ponceau (0,2% Ponceau en 3% TCA; Sigma) para comprobar la eficiencia del proceso.

Para la saturación de la membrana se utilizó leche en polvo al 5% o suero de albúmina bovina (BSA) también al 5% disuelta en TBS con 0,1% de Tween-20. Las membranas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 1h o durante la noche a 4°C. Tras 3 lavados con TBS de 15 min, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes a temperatura ambiente durante 45 min. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 15 min con TBS. La señal específica de las proteínas ensayadas se obtuvo tras la incubación de la membrana con la solución de revelado ECL (Amersham) y la exposición de

películas X-OMAT (KODAK).

3.3.3) Inmunofluorescencia.

Los análisis de inmunofluorescencia se llevaron a cabo utilizando MEFs sembrados sobre cubreobjetos en placas de 12 pocillos e infectados a una multiplicidad de infección (MDI) 5 UFP/célula con los virus WR, MVA y NYVAC. Tras un lavado con PBS, las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% a distintos tiempos post-infección. A continuación, las muestras fueron tratadas con NH_4Cl 50 mM durante 10 min y se permeabilizaron con 0,2% saponina en PBS. La incubación con los anticuerpos primarios específicos frente a las proteínas virales A27, A14 y A17 se realizó durante 90 min a 37°C. Los anticuerpos primarios unidos a sus proteínas específicas se detectaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a los fluoróforos Alexa-488 o Alexa-594. Después de cada incubación, los cristales se lavaron 3 veces con PBS. La actina se detectó utilizando una sonda conjugada a TRITC que reconoce la faloidina (Sigma). Los núcleos se detectaron mediante el uso de 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI; Sigma). Finalmente, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos en presencia de la solución de montaje Prolong (Invitrogen). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal TCS SP5 (Leica).

3.4) Manipulación de virus.

3.4.1) Crecimiento, purificación y titulación de virus.

La obtención de diferentes preparaciones virales se ha realizado siguiendo los protocolos generales descritos en *Current procolos in molecular biology (actualizacion de Earl y Moss, 1991)* y los protocolos de purificación por colchones de sacarosa establecidos por Joklik (Joklik, 1962) y modificados por M.Esteban (Esteban, 1984).

Se infectaron células BSC40 para crecer los virus WR y NYVAC y células BHK21 para crecer el virus MVA a una multiplicidad de infección de 0,01 UFP/célula. Aproximadamente a los 3 días, cuando se observó un efecto citopático del 100% en el cultivo celular, se recogieron las células y se sometieron a una centrifugación de 20 min a 1500 rpm. Después de un lavado con PBS y una nueva centrifugación, el precipitado se resuspendió en 10 ml de Tris-HCl 10 mM pH 9. A continuación, se realizaron 2 ciclos de sonicación (3 pulsos de 10 seg con intervalos de 10 seg sin sonicacion) y centrigrugación durante 5 min a 2.000 rpm. Los sobrenadantes resultantes se mezclaron en una muestra única, se dispusieron sobre un volumen de 20 ml de sacarosa al 36% (MVA o NYVAC), y se centrifugaron durante 1 h a 20.000 rpm utilizando un rotor SW28 (Beckman). El precipitado resultante se resuspendió en Tris-HCl 10 mM pH 9, se dispuso sobre un nuevo colchon o gradiente de sacarosa y se centrifugó de nuevo como en el paso anterior. Finalmente, el precipitado se resuspendió en un

volumen aproximado de 1 ml de Tris-HCl por cada 10 placas p150 infectadas. El virus resultante se guardó en alícuotas a -70° C hasta su utilización. En el caso de WR los sobrenadantes se dispusieron sobre un gradiente de sacarosa (45-20%), se centrifugaron a 4°C durante 20 min a 15.000 rpm y se recogió la banda resultante. A continuación se añadió Tris-HCl 10 mM pH 9 y se volvió a centrifugar durante 45 min a 20.000 rpm. El precipitado se resuspendió en Tris-HCl y las alícuotas se guardaron a -70°C.

La titulación de los virus purificados se realizó sobre monocapas de DF1 mediante la infección con diluciones seriadas del virus en medio DMEM sin suero. Entre las 36 y 48 horas post-infección (hpi) las células fueron fijadas *in situ* con una solución Metanol-Acetona (1:1) durante 2 min a temperatura ambiente. Una vez fijadas, se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo, diluido 1:1.500 en PBS suplementado con 3% de FCS, que reconoce proteínas estructurales de VACV durante 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo generado en cabra conjugado con peroxidasa, diluido 1:1.000 en PBS + 3% FCS, durante 90 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS y los focos de células infectadas fueron detectados con una solución que contenía 3,3'-diaminobenzidina tetrahydrochloride (DAB, 0,83 mg/ml, Sigma) en PBS con NiSO₄ (0,01%) y H₂O₂ (0,001%). La reacción se detuvo mediante un lavado final con PBS al aparecer la señal correspondiente. El título viral se expresó en unidades formadoras de placa/ml (UFP/ml).

3.4.2) *Análisis de la replicación viral. Curvas de crecimiento.*

Con el fin de analizar los perfiles de crecimiento viral, se infectaron monocapas de MEFs crecidas en placas de 12 pocillos a una MDI de 0.01 UFP/célula con los virus WR, MVA o NYVAC. A diferentes tiempos post-infección (0, 24, 48, 72h) las muestras fueron recogidas según lo descrito previamente {Najera, 2006 #109} y tituladas como se describe en el apartado 3.4.1.

Para el ensayo de los inhibidores de las MAPKs se utilizaron los inhibidores UO126 (Cell Signalling) para el bloqueo de ERK y SB203580 (Calbiochem) para el bloqueo de p38MAPK, que fueron añadidos a los cultivos celulares a una concentración de 10 y 5 µM y 1h o 30 min antes de la infección, respectivamente.

3.4.3) *Estudio del efecto citopático producido por MVA.*

Con el objetivo de analizar el efecto citopático producido por MVA, se infectaron células crecidas en placas de 6 pocillos a una MDI de 0,01 UFP/cél. y se visualizó dicho efecto mediante un microscopio de contraste de fase.

3.4.4) Microscopía electrónica.

El procesamiento de las muestras para microscopia electrónica fue realizada en colaboración con la Dra. María Teresa Rejas del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM-SO).

Monocapas confluentes de MEFs fueron infectadas con MVA a una MDI de 5 UFP/célula. A las 16 hpi se fijaron *in situ* durante 2 horas con 4% paraformaldehído + 2% glutaraldehído en tampón Na/Na₂ 0,1M. Posteriormente las muestras se lavaron 3 veces durante 10 min en tampón Na pH 7.4 y, a continuación, se recogieron con una raspador celular en 1,5 ml del mismo tampón de lavado. Todo el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente. Las muestras se guardaron a 4°C hasta su tratamiento posterior. Las muestras fijadas se procesaron mediante inclusión convencional en epoxi-resinas EM-812 (Taab Laboratories, Adermaston, Berkshire, UK). La post-fijación se realizó con una mezcla de tetróxido de osmio al 1% y ferricianuro de potasio al 0,8% en agua destilada durante 1 hora a 4°C. Después de 4 lavados con tampón HEPES, las muestras se tiñeron con acetato de uranilo al 2% y se deshidrataron progresivamente con distintas concentraciones de acetona (50, 70, 90 y 100%), durante 100 min a 4°C. A continuación, se infiltraron en resina durante un día a temperatura ambiente y finalmente se polimerizaron a 60°C durante 3 días. Seguidamente, se cortaron secciones ultrafinas de aproximadamente 70 nm de grosor, todas ellas paralelas a la superficie del cubreobjetos de thermax, y se dispusieron en rejillas de cobre de 0,5 µm. Finalmente, se analizaron con un microscopio electrónico de transmisión modelo Jeol JEM 1011.

Para la cuantificación de intermediarios virales mediante análisis por microscopía electrónica, se analizaron un total de 30 células infectadas por cada tipo celular (DUSP1 WT o KO). Los resultados se representan como el porcentaje relativo de cada intermediario viral respecto al total de viriones analizados. Aproximadamente, se analizaron 1400 viriones por tipo celular.

3.5) Manipulación de animales.

Los protocolos de experimentación animal llevados a cabo en este estudio han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEACNB) del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC, Madrid, España) de acuerdo con las instrucciones nacionales e internacionales sobre protección de animales utilizados en experimentación y con otros fines científicos y de acuerdo con el bienestar animal en lo que respecta a su uso, transporte y sacrificio. Asimismo, los protocolos cumplen con la normativa vigente reflejada en el Real Decreto (RD 1201/2005). Número de permisos: 10-018 and 10-023.

3.5.1) Protocolos de inmunización.

En todos los experimentos realizados se emplearon ratones de edades comprendidas entre las 6-10 semanas. En la tabla II, se detallan las diferentes rutas de inoculación, volúmenes de inóculo, los virus y las dosis empleadas en las distintas rutas y para que tipo de ensayo han sido utilizadas dichas rutas.

3.5.2) Colonia de ratones *DUSP1*: Características y genotipado.

Los ratones *DUSP1* KO se generaron sobre un fondo C57BL/6 y han sido previamente descritos (Dorfman et al, 1996).

Brevemente, el exón 2 del gen *DUSP1* fue interrumpido por el gen *neo*, permitiendo la selección de los cultivos con la droga G418 a una concentración de 400 µg/ml e impidiendo la correcta expresión del gen *DUSP1*.

Para el genotipado de las colonias de ratones *DUSP1* WT y *DUSP1* KO en fondo C57BL/6 se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la sección 2.2. Los oligonucleótidos E2 y PGKT1 corresponden a los oligonucleótidos directos utilizados para la PCR de genotipado. E2 hibrida al comienzo de la secuencia del exón 2 y PGKT1 en la secuencia insertada del gen *neo*. El oligonucleótido inverso es W3REV y es común para amplificar ambos fragmentos.

3.5.3) Obtención de muestras de los animales inmunizados.

Los animales inmunizados fueron sacrificados en una cámara de CO₂ y posteriormente rociados con etanol para evitar posibles contaminaciones durante el proceso de extracción de órganos. En el caso de inmunizaciones por ruta intranasal, se extrajeron los pulmones de dichos animales y en el caso de inmunización por ruta intraperitoneal se recogieron: lavados peritoneales, bazo, hígado, nódulos linfáticos y ovarios/testículos. Todas las muestras se guardaron a -80° C hasta su uso.

Una vez extraídos los distintos órganos se seleccionaron partes representativas de cada uno de ellos en el caso de los órganos de mayor tamaño u órganos completos en el caso de los de menor tamaño (nódulos y ovarios).

Para el estudio de la producción de citoquinas proinflamatorias se analizaron sueros y lavados bronco-alveolares. Los sueros se obtuvieron mediante el sangrado parcial de vena submaxilar de los ratones inmunizados a diferentes tiempos post-inoculación. Posteriormente, la sangre extraída fue incubada durante 1 hora a 37°C seguida de otra incubación durante la noche a 4°C. Finalmente, el suero se obtuvo tras una centrifugación durante 20 min a 2.000 rpm. Los lavados bronco-alveolares fueron realizados tras el sacrificio de los animales inyectando 1 ml de PBS estéril a través de la tráquea.

RUTA DE INOCULACIÓN	INÓCULO	DOSIS	ENSAYO
INTRANASAL (i.n.) 20 µl	WR	5 x 10 ⁵ - 5 x 10 ⁶ UFP/ratón	Patogenia
	WR-LUC	5 x 10 ⁶ UFP/ratón	Replicación viral (pulmones)
	WR MVA NYVAC	10 ⁷ UFP/ratón ----- 2 x 10 ⁷ UFP/ratón	ICS BAL
INTRAPERITONEAL (i.p.) 200 µl	WR-LUC	2 x 10 ⁷ UFP/ratón	Replicación viral
	WR MVA NYVAC	1 x 10 ⁷ UFP/ratón ----- 2 x 10 ⁷ UFP/ratón	ICS Macrófagos
ESCARIFICACIÓN en la base de la cola (e.c.) 10 µl	MVA-LUC	10 ⁷ UFP/ratón	Patogenia
	MVA	10 ⁷ UFP/ratón	Replicación viral (cola)

Tabla III: Rutas de inoculación y características de las mismas en los distintos ensayos realizados en este trabajo. ICS: Marcaje intracelular (del inglés “Intracellular cytokine staining”), BAL: Lavado broncoalveolar (del inglés “bronchoalveolar lavage”).

3.5.4) Evaluación de la patogenia viral.

Para el ensayo de patogenia viral se inoculó a los ratones por vía intranasal empleando dos dosis distintas (5 x 10⁵ y 5 x 10⁶ UFP/ratón), una por encima y otra por debajo de la dosis letal para la cepa competente en replicación WR. La patogenia viral se evaluó analizando

distintos síntomas de enfermedad como el pelo erizado, el encorvamiento, la falta de movimiento y la pérdida de peso de los animales infectados. Cuando la pérdida de peso fue superior al 20-25% y/o se producía un empeoramiento claro de la enfermedad basado en la evaluación de los síntomas, los animales fueron sacrificados por motivos éticos.

3.5.5) *Análisis de la replicación viral. Determinación de los niveles de luciferasa.*

Las muestras de tejido extraídas de los animales infectados se disgregaron con un homogeneizador mecánico en medio DMEM sin suero y se sometieron a 3 ciclos de congelación/descongelación y sonicación. A continuación, se centrifugaron las muestras y se tituló el sobrenadante en células DF1 como se detalla en el apartado 3.4.1. Los valores obtenidos se representaron como UFP/mg tejido. La cantidad de proteína en cada tejido se midió utilizando el kit comercial BCA (Pierce Biotechnology).

Alternativamente, se evaluó la expresión génica de los virus recombinantes WR-luc, MVA-luc o NYVAC-luc, mediante el ensayo de luciferasa como medida indirecta de la replicación viral. En este caso, las muestras se homogeneizaron en tampón de extracción de luciferasa (Promega) y se midió la actividad luciferasa en presencia de luciferina y ATP mediante el uso de un luminómetro Lumat LB 9501 (Berthold Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los valores obtenidos se mostraron como Unidades relativas de luciferasa (URL) por mg de proteína (URL/mg).

3.5.6) *Evaluación de la secreción de citoquinas por células T.*

Para determinar la secreción de citoquinas por parte de las células T del bazo de los ratones DUSP1 WT y KO infectados con distintos virus se utilizó el método de marcaje intracelular de citoquinas (ICS), seguido de un análisis de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo (FACS). 4×10^6 esplenocitos fueron resuspendidos en RPMI + 10% FCS y sembradas en una placa de 96 pocillos en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Golgiplug (BD Biosciences) para inhibir la secreción de citoquinas. Las células fueron estimuladas durante 6 h a 37°C y 5% de CO_2 con el péptido de VACV E3 a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$. Al cabo de las 6 horas de estimulación, se lavaron, se incubaron con marcadores de superficie que determinaron el linaje celular (CD3, CD4 o CD8), se fijaron y permeabilizaron utilizando el kit BD Cytfix/Cytoperm™ (Becton Dickinson) y se incubaron de nuevo con los anticuerpos que reconocían las diferentes citoquinas acoplados a los diferentes fluorocromos. Los anticuerpos frente a las diferentes citoquinas con los fluorocromos correspondiente utilizados para analizar la respuesta inmune adaptativa fueron los siguientes: CD3-FITC o -PerCP, CD4-Alexa 700 o -APCCy7, CD8-PerCP o -V500, IL-2-PE or -APC, IFN- γ -APC o -PE-Cy7 y TNF- α -PECY-7 o -PE. Todos los anticuerpos proceden de BD Biosciences. Las células muertas se excluyeron

mediante el kit violet LIVE/DEAD stain (Invitrogen).

Las muestras sometidas al ensayo por ICS se analizaron utilizando un el citómetro de flujo LSRII (Becton Dickinson). El número de eventos procesados varió entre 10^5 y 10^6 . En primer lugar, se seleccionó el grupo de células vivas en el cultivo analizado. En segundo lugar, los linfocitos fueron seleccionados por tamaño y complejidad. A continuación, se seleccionaron aquellos que pertenecían al grupo CD3+ y sobre este grupo se seleccionaron las células CD4+ y CD8+ para los que finalmente se determinó la secreción de IFN- γ , TNF- α e IL-2.

Una vez procesadas las muestras en el citómetro de flujo, se analizaron mediante el programa informático FlowJo, versión 8.5.3 (Tree Star, Ashland, OR) y se elaboraron los gráficos correspondientes con el programa SPICE (Simplified Presentation of Incredibly Complex Evaluations, versión 4.1.5, Mario Roederer, Vaccine Research Center, NIAID, NIH).

3.5.7) Evaluación de los niveles de citoquinas mediante ELISA y LUMINEX.

Los distintos niveles de las citoquinas proinflamatorias se analizaron mediante la técnica de LUMINEX. Alternativamente, los niveles de IFN- α e IFN- β se midieron utilizando un kit comercial de ELISA (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ).

3.6) Análisis estadístico.

La significancia estadística entre distintos grupos o muestras sujetas a comparación fue analizada mediante un test t de Student. Solamente aquellos valores con un valor p por debajo de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. Para todos los ensayos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ *** $p < 0,001$.

En el caso de los valores obtenidos en el análisis de células T secretoras de citoquinas, el test utilizado para evaluar la significancia estadística de las diferencias encontradas entre grupos corrige las medidas respecto de las obtenidas con el medio de cultivo (RPMI) y calcula intervalos de confianza y valores p de las muestras problema. Sólo los valores significativamente mayores que sus correspondientes valor es control con RPMI se representan en las figuras, considerando que éstos controles nunca excedían un 0,05% de la respuesta total.

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

1) Análisis del comportamiento *in vitro* del virus vaccinia en presencia o ausencia de DUSP1.

1.1) La infección por el virus vaccinia induce la expresión de DUSP1 en células en cultivo.

Previamente a este estudio se habían realizado en nuestro laboratorio ensayos de microarrays con el objetivo de conocer el efecto de la infección por el virus vaccinia en la expresión de genes celulares. Para ello, se infectaron células HeLa con WR (Guerra et al, 2003), (Domingo-Gil et al, 2010), MVA (Guerra et al, 2004) o NYVAC (Guerra et al, 2006) y se analizó la expresión de ARN mensajero (ARNm) a distintos tiempos post-infección. Los genes analizados se agruparon en aquellos cuya expresión estaba aumentada respecto a una célula sin infectar y los genes cuya expresión se veía disminuida. La expresión de la mayor parte de los genes se veía reducida durante la infección. Entre los genes cuya expresión aumentaba durante la infección decidimos analizar la función de la fosfatasa celular de especificidad dual (DUSP1) durante la infección por el virus vaccinia (VACV).

1.1.1) *La infección por VACV induce la expresión de DUSP1 a nivel de ARNm y a nivel de proteína.*

En primer lugar, nos propusimos analizar la cinética de transcripción del ARN mensajero (ARNm) de DUSP1 durante la infección por VACV con el objetivo de validar los datos obtenidos previamente en el laboratorio y por otros autores mediante microarrays (Domingo-Gil et al, 2010), (Ludwig et al, 2005), (Langland et al, 2006). Para ello, infectamos células HeLa con los virus WR, MVA o NYVAC a una MDI de 5 UFP/cél. y recogimos muestras de los cultivos infectados a distintos tiempos post-infección (2, 6 y 16 hpi). Una vez aislado el ARN, las muestras se analizaron mediante la técnica de RT-PCR cuantitativa (RT-PCRq), utilizando como control de gen invariable el gen *HPRT1*. Como se observa en la [Tabla IV](#), se produjo un aumento de los niveles de ARNm de DUSP1 a los tres tiempos post-infección analizados durante la infección con los tres virus, aunque este aumento fue más pronunciado a las 6 hpi, especialmente durante la infección con NYVAC.

	Tasa de cambio		
	2h	6h	16h
WR	14,9	21,9	4,6
MVA	5,6	16,7	2,92
NYVAC	11,7	101,5	23,1

Tabla IV: Niveles de transcripción de ARN mensajero de DUSP1 durante la infección con VACV. Células HeLa fueron infectadas a una multiplicidad de infección de 5 UFP/cel con los virus WR, MVA o NYVAC. A los distintos tiempos post-infección indicados, las células se recogieron, se extrajo el ARN y se determinaron los niveles de transcripción de DUSP1 mediante RT-PCRq.

A continuación, quisimos analizar los niveles de expresión de la proteína DUSP1. Para ello, infectamos células HeLa con los virus WR, MVA o NYVAC a 5 UFP/cél y, a distintos tiempos post-infección, las muestras fueron recogidas y analizadas por Western-blot. Como se observa en la Fig.8, en células no sometidas al estímulo viral los niveles de expresión de DUSP1 se encuentran por debajo del nivel de detección de la técnica de Western-blot. Sin embargo, la expresión de DUSP1 aumenta de forma específica en respuesta a la infección con los tres virus a las 4 hpi y este aumento se mantiene durante el intervalo de tiempo analizado. Los niveles de expresión más altos los encontramos durante la infección con el virus atenuado NYVAC.

Con el objetivo de determinar si durante la infección por VACV no sólo aumentan los niveles de ARNm y de proteína de DUSP1 sino también se produce una estabilización de la proteína, decidimos analizar el estado de fosforilación de DUSP1 durante la infección por VACV. Para ello, empleamos un anticuerpo que reconoce específicamente los residuos fosforilados serina 359 y serina 364, responsables de la estabilización de la proteína y, por tanto, de la prolongación de la vida media de la misma. Como se puede ver en la Fig.8, detectamos fosforilación de DUSP1 durante la infección con los tres virus y ésta coincide con el tiempo en el que detectamos un aumento de la expresión de DUSP1 a las 4 hpi que se prolonga hasta las 8 hpi. Estos resultados demuestran que la infección por VACV ejerce un papel en la transcripción, traducción y modificación post-traducciona de DUSP1.

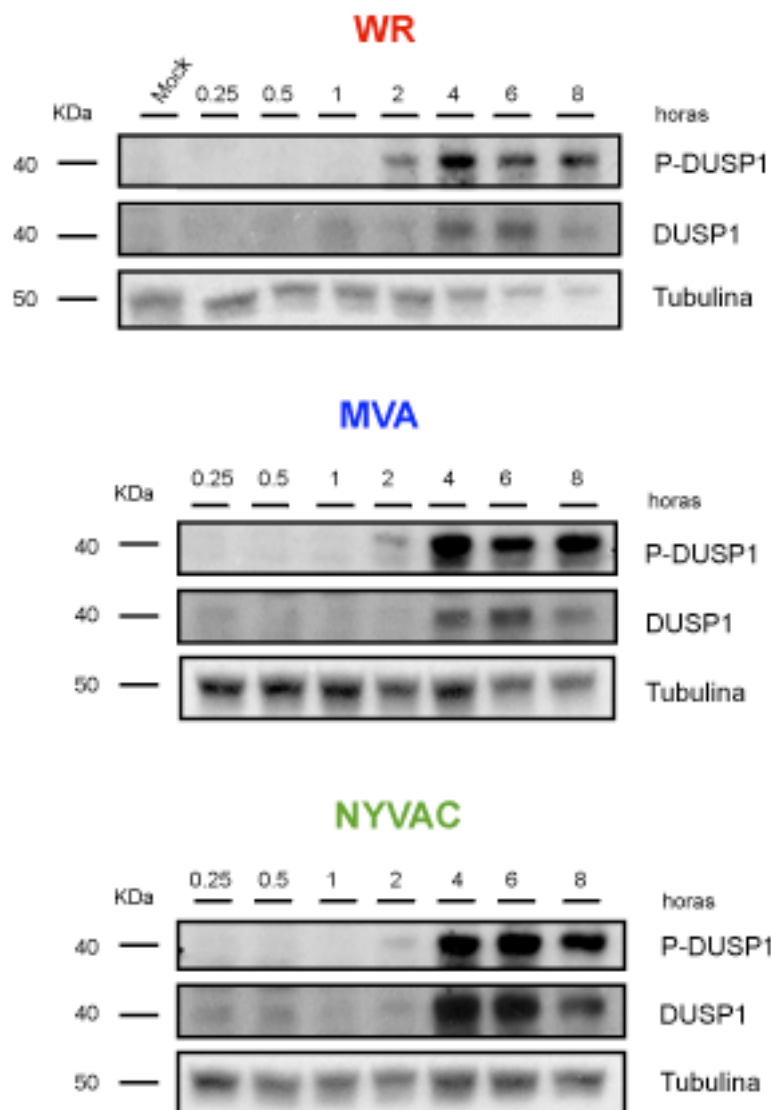


Figura 8: Niveles de expresión de la proteína DUSP1 durante la infección con VACV. Células HeLa fueron infectadas a una multiplicidad de infección de 5 UFP/cél con los virus WR, MVA o NYVAC. A los distintos tiempos post-infección indicados, las células se recogieron, se obtuvieron los extractos proteicos y se analizaron cantidades equivalentes de proteína mediante Western-blot utilizando anticuerpos específicos frente a DUSP1, P-DUSP1 o tubulina. Mock: células control no infectadas.

1.1.2) La síntesis de proteínas virales tempranas es necesaria para la inducción de DUSP1.

A continuación, quisimos analizar en detalle cómo se produce esta inducción de DUSP1 en respuesta a la infección por VACV y para ello analizamos el papel de determinadas proteínas

virales en este proceso. Para ello, tratamos células HeLa con Arabinofuranosil Citidina (Ara-C) para inhibir la síntesis de ADN y a continuación infectamos con el virus WR a una MDI de 5 UFP/cél. Como se observa en la Fig.9, en las células tratadas con Ara-C se produce la síntesis de la proteína temprana E3 pero no de la tardía A17. Si analizamos la expresión de DUSP1 en estos cultivos, podemos observar que en presencia de Ara-C la inducción muestra una cinética similar a la de un cultivo control infectado sin tratar, lo que demuestra que la expresión de proteínas virales tardías no es necesaria para la inducción de DUSP1.

Para determinar si la expresión de proteínas virales tempranas o simplemente la entrada del virus en la célula es la responsable de dicha inducción, decidimos infectar las células con un virus inactivado por calor que es capaz de penetrar en el citoplasma de la célula infectada pero no de realizar la transcripción temprana. Como se observa en la Fig.9, no detectamos inducción de DUSP1 cuando se infectaron las células con el virus inactivado, lo que demuestra que la expresión de proteínas virales tempranas es necesaria para el aumento de expresión de DUSP1 durante la infección por VACV.

1.1.3) La infección por VACV induce la fosforilación de DUSP1 a través de la quinasa celular ERK.

A continuación, decidimos determinar la quinasa responsable de la fosforilación de las serinas 359 y 364 de la proteína DUSP1, responsables del aumento de su vida media, durante la infección por VACV. Se sabe que la quinasa responsable de dichos residuos en respuesta a otros estímulos es ERK (Chen et al, 2002), por lo que quisimos determinar si durante el transcurso de la infección por VACV la fosforilación de DUSP1 observada (Fig.8) era producida por la acción de ERK o por una quinasa viral. Para ello, utilizamos un inhibidor específico de la actividad de ERK, UO126. En presencia del inhibidor, no pudimos detectar la fosforilación de ERK a tiempos tempranos de la infección, al contrario de los que observamos en las células control infectadas sin tratar (Fig.10). Debido a que estudios previos en los que se demuestra que la inhibición exógena de ERK durante la infección por VACV causa una disminución en la eficiencia de replicación del virus (Andrade et al, 2004), decidimos retirar el inhibidor del cultivo previamente a la infección con WR. A causa de esto, la activación de ERK comienza alrededor de las 2 hpi. Como se observa en la Fig.10, no detectamos fosforilación de DUSP1 tras el tratamiento con el inhibidor de ERK, lo que indica que la fosforilación de DUSP1 inducida durante la infección por WR requiere la actividad de la quinasa celular ERK.

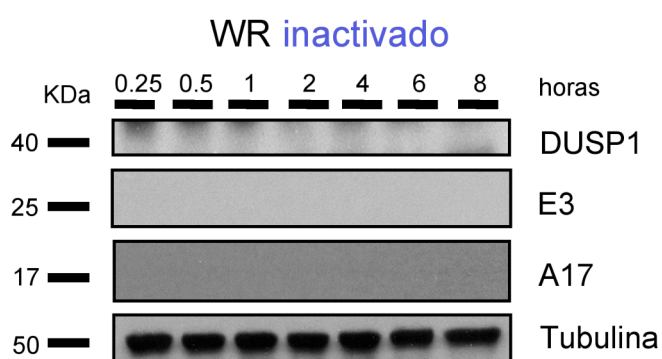
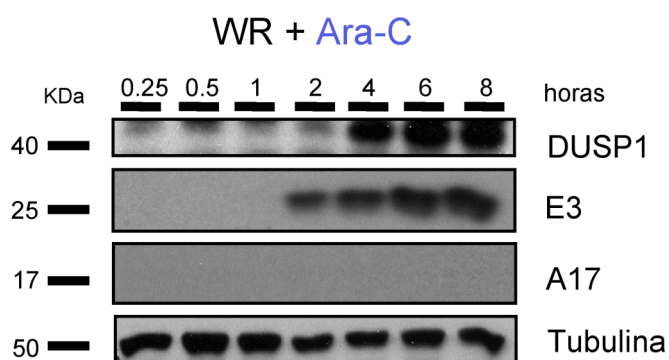
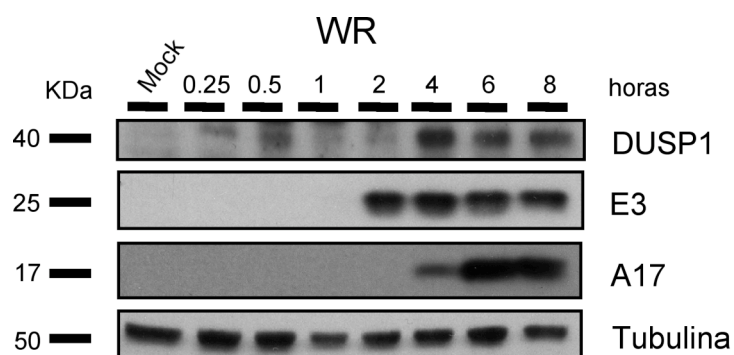


Figura 9: Efecto de la síntesis de proteínas virales en el aumento de expresión de DUSP1 durante la infección por VACV. Células HeLa fueron no tratadas o tratadas con Ara-C (40 μ g/ml) y a continuación fueron infectadas con el virus WR a 5 UFP/cel, inactivado o no por calor (1horas/ 65°C). A los distintos tiempos post-infección indicados, se recogieron muestras y se analizaron cantidades equivalentes de proteína mediante Western-blot utilizando anticuerpos específicos frente a las proteínas celulares DUSP1 y tubulina y las proteínas virales E3 y A17.

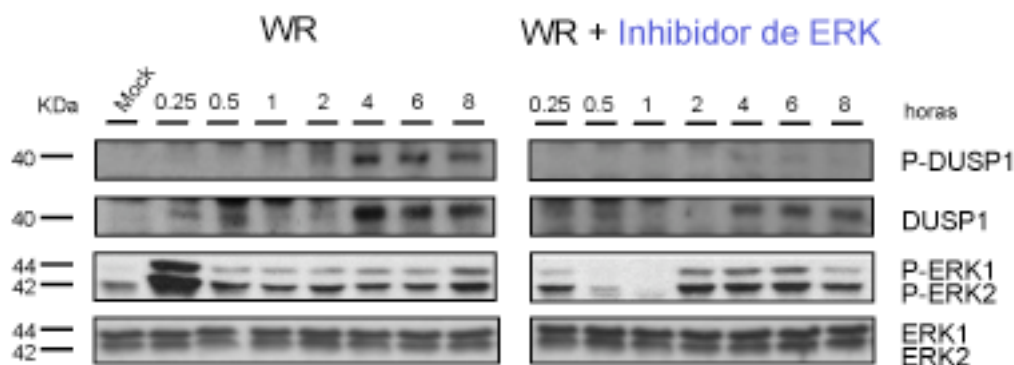


Figura 10: Implicación de la quinasa celular ERK en la fosforilación de DUSP1 inducida tras la infección con WR. Células HeLa no tratadas o tratadas con el inhibidor específico de ERK UO126 a una concentración de 10 μ M durante 30 min fueron infectadas con WR a 5 UFP/cél. A los tiempos post-infección indicados las muestras se recogieron y se analizaron cantidades equivalentes de los extractos proteicos extraídos mediante Western-blot utilizando anticuerpos frente a las proteínas celulares DUSP1, P-DUSP1, ERK, P-ERK.

1.2) Análisis del crecimiento viral de VACV en presencia o ausencia de DUSP1 en células murinas en cultivo.

1.2.1) El crecimiento viral de los virus WR y MVA es mayor en ausencia de DUSP1.

Se ha descrito que DUSP1 desempeña un papel importante en la regulación negativa de la actividad de las MAPKs en respuesta a diversos patógenos como bacterias y parásitos {Frazier, 2009 #3}. Sin embargo, la información disponible acerca de la función de DUSP1 en las infecciones virales es escasa. Por lo tanto, con el objetivo de analizar el papel de DUSP1 en la replicación de VACV, infectamos MEFs DUSP1 WT y KO con los virus WR, MVA o NYVAC a 0,01 UFP/cél y analizamos el crecimiento de los virus a distintos tiempos post-infección.

Como se muestra en la Fig.11, observamos un aumento significativo en la replicación de WR en los MEFs DUSP1 KO respecto a la observada en los MEFs WT. Las diferencias más llamativas en el rendimiento viral las encontramos en el caso de MVA. En presencia de DUSP1 no encontramos evidencias de replicación de MVA, mientras que en ausencia de DUSP1 MVA es capaz de obtener un rendimiento viral similar al observado en una línea permisiva. La diferencia en la replicación de MVA entre ambas líneas celulares es de 2 logs a las 24 hpi y va incrementando a lo largo del tiempo hasta llegar aproximadamente a los 3 logs de diferencia a

las 72 hpi. Por último, no pudimos detectar evidencias de replicación viral en la infección con NYVAC ni en MEFs WT ni KO, lo que es consistente con estudios previos que demuestran que NYVAC es incapaz de replicar en líneas celulares murinas (Tartaglia et al, 1992).

1.2.2) *El virus atenuado MVA es capaz de liberar su progenie al medio extracelular en ausencia de DUSP1 en células murinas en cultivo.*

Para conocer en más detalle la implicación de DUSP1 en la replicación de MVA, realizamos un nuevo ensayo de rendimiento viral en el que evaluamos el virus asociado a célula y el virus en el sobrenadante de manera independiente. Para ello, infectamos MEFs DUSP1 WT y KO con MVA a una MDI de 0,01 UFP/cél y recogimos muestras a distintos tiempos post-infección. Como se observa en la Fig.12, existen diferencias significativas de 2 logs en replicación entre los MEFs WT y KO infectados tanto en la producción de virus asociado a célula como en la de virus en el sobrenadante. Cabe destacar que no fuimos capaces de detectar la presencia de progenie viral en el sobrenadante de los MEFs WT infectados con MVA.

1.2.3) *La infección por MVA en ausencia de DUSP1 induce efecto citopático en células murinas en cultivo.*

El efecto citopático (Adler et al) es el conjunto de cambios morfológicos que sufre una célula o un conjunto de ellas cuando se ve sometida a un estrés de tipo patogénico. Con el objetivo de observar los focos de infección inducidos en los MEFs infectados con el virus atenuado MVA en presencia o ausencia de DUSP1, realizamos un seguimiento a lo largo del tiempo de las lesiones producidas en los cultivos celulares infectados mediante microscopía de contraste de fase.

En la Fig.13A se muestra un ejemplo representativo del EC inducido por el virus MVA en MEFs DUSP1 WT y KO. El EC observado en el cultivo de células KO infectadas fue aumentando progresivamente desde las 24 hpi a medida que avanzó la infección de manera que encontramos un mayor número de lesiones y un mayor tamaño de las mismas con el tiempo. Sin embargo, en las células WT infectadas sólo observamos lesiones asociadas al EC producido por el virus a las 72 hpi, siendo por tanto el EC claramente menor al observado en las células KO.

Con el objetivo de confirmar que las lesiones observadas se correspondían

efectivamente con focos de células infectadas, realizamos un ensayo de inmunotinción en cultivos de MEFs DUSP1 WT y KO infectados con MVA con anticuerpos específicos para proteínas de VACV. Como puede observarse en la Fig.13B, únicamente pudimos detectar focos de células infectadas en las muestras de MEFs KO infectados, observándose un aumento progresivo en el número de dichos focos hasta las 72 hpi.

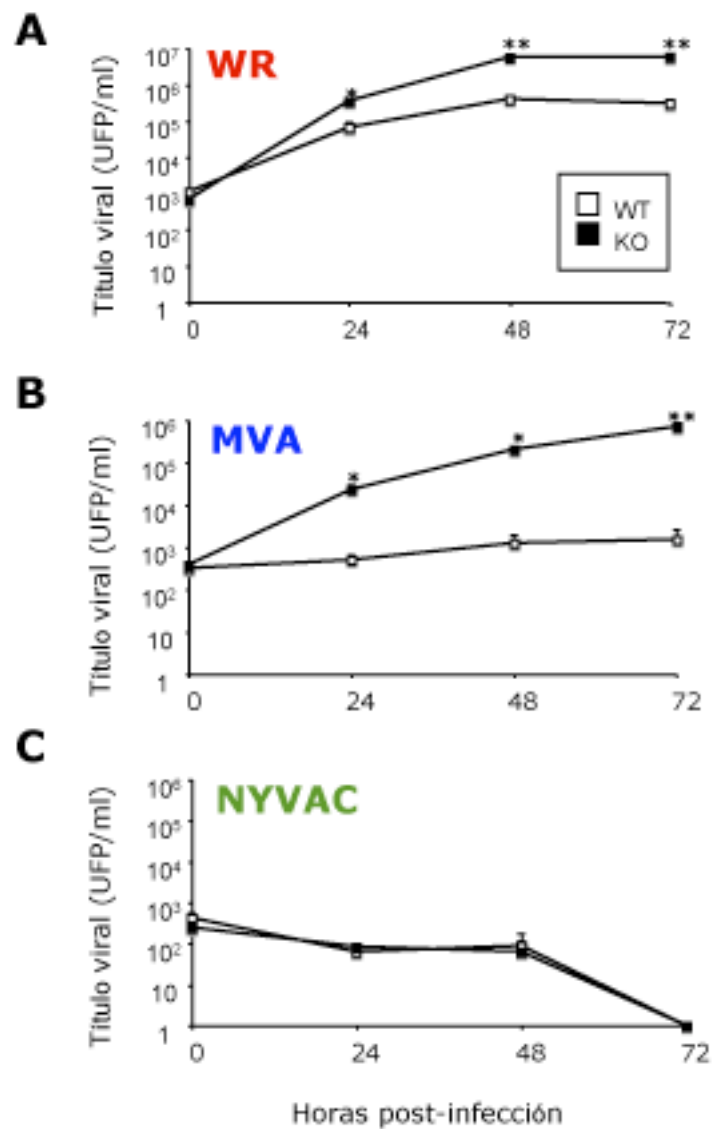


Figura 11: Replicación de VACV en presencia o ausencia de DUSP1. MEFs DUSP1 WT y KO se infectaron con los virus WR, MVA o NYVAC a una MDI de 0,01 UFP/cél. A los tiempos post-infección indicados se recogieron las muestras y se cuantificó la presencia de virus total mediante un ensayo de inmunotinción en células DF-1.

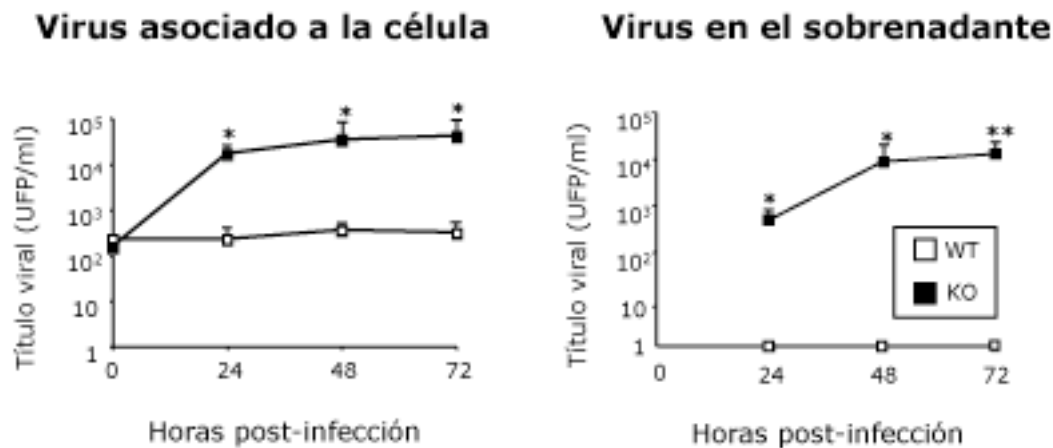


Figura 12: Replicación de MVA en presencia o ausencia de DUSP1. MEFs DUSP1 WT y KO se infectaron con el virus MVA a 0,01 UFP/cél. A los tiempos post-infección indicados se recogieron las muestras y se cuantificó la presencia de virus asociado a célula o en el sobrenadante mediante un ensayo de inmunotinción en células DF-1.

Este conjunto de resultados demuestran que DUSP1 desempeña una función importante en la replicación de VACV, especialmente en la del virus atenuado MVA.

1.3) Estudio de la morfogénesis viral en presencia o ausencia de DUSP1.

1.3.1) *DUSP1 no está implicada en eventos tempranos del proceso de morfogénesis de MVA. Análisis de la expresión de las proteínas A14 y A17 mediante microscopía confocal.*

Una vez establecido que MVA es capaz de completar su ciclo viral en células murinas en ausencia de DUSP1 y teniendo en cuenta que MVA presenta un bloqueo en el proceso de morfogénesis en líneas celulares no permisivas para la infección (Sancho et al) quisimos determinar en cuál de los eventos que constituyen el proceso de morfogénesis está implicado DUSP1. Para ello, analizamos estadios tempranos, intermedios y tardíos de dicho proceso morfogénico.

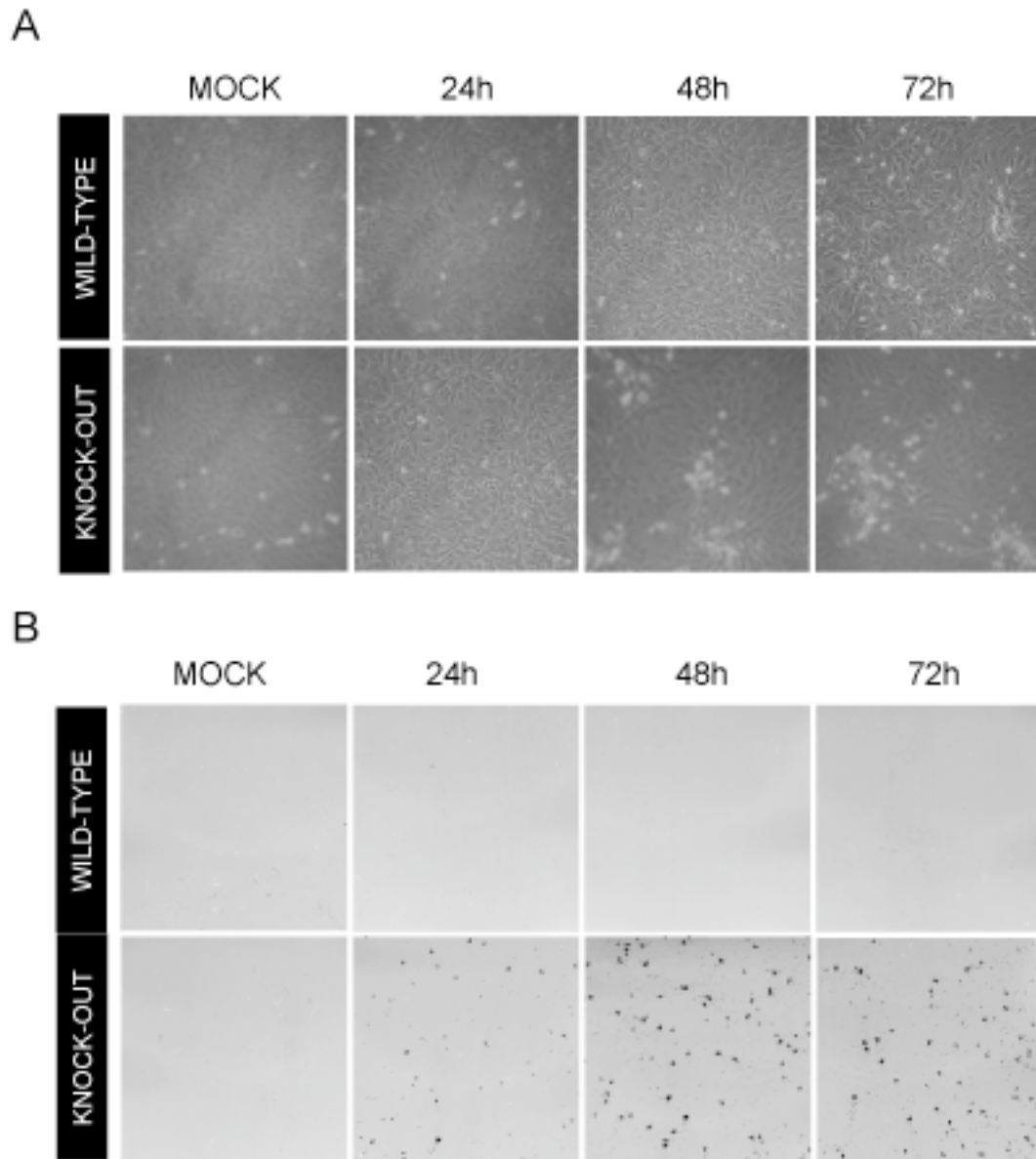


Figura 13: Efecto citopático producido por MVA e inmunotinción de focos de infección en presencia o en ausencia de DUSP1. MEFs DUSP1 WT y KO se infectaron con el virus MVA a una MDI de 0,01 UFP/cél. A los tiempos post-infección indicados se detectaron los focos de infección producidos por la infección con MVA en los cultivos infectados mediante microscopía de contraste de fase (A) y mediante un ensayo de inmunotinción utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce proteínas de VACV (B).

En primer lugar, infectamos MEFs DUSP1 WT y KO con los virus WR, MVA o NYVAC a 5 UFP/cél y analizamos, mediante microscopía confocal, la expresión de las proteínas virales de membrana A14 (p16) y A17 (p17), importantes para la formación de crestas en los estadios

tempranos de la morfogénesis de VACV. En la Fig.14A, se puede observar que no existen diferencias en los patrones de expresión y localización de estas proteínas virales en las células DUSP1 WT y KO para ninguno de los virus ensayados.

En los paneles en blanco y negro de la Fig.14B, se muestran por separado los marcajes de ADN y de las proteínas virales A14 o A17 en los MEFs DUSP1 WT y KO infectados con MVA pudiendo observarse con mayor claridad que A14 y A17 presentan un marcaje punteado específico que se localiza o bien en la región perinuclear, donde se encuentran las proteínas recién sintetizadas, o bien en el citoplasma cerca de las factorías virales.

Debido a que no observamos diferencias en el patrón de expresión de A14 y A17 entre las células DUSP1 WT y KO infectadas con ninguno de los tres virus, podemos concluir que DUSP1 no está implicado en los estadios tempranos de la morfogénesis de VACV.

1.3.2) *DUSP1 no está implicada en el procesamiento proteolítico viral. Análisis de la expresión de las proteínas L4, A10 y A17 mediante Western-blot.*

Posteriormente a la formación de las crestas y de los viriones inmaduros tiene lugar el procesamiento proteolítico de proteínas virales localizados en la membrana o el core viral. Entre estas proteínas se encuentran L4 (p25K), implicada en la unión a ADN y ARN de cadena sencilla y en el correcto ensamblaje del core viral, A10 (p4a), necesaria para la correcta organización y empaquetamiento de la matriz viroplasmática (constituye el 28% del core) y A17 (p17) que junto con A14, desempeña un papel importante en la formación de crestas y en el anclaje de la proteína viral de membrana A27 (p14).

Con el objetivo de analizar dicho procesamiento proteolítico, infectamos MEFs DUSP1 WT y KO con WR, MVA o NYVAC a 5 UFP/cél y determinamos mediante Western-blot la presencia de las correspondientes formas procesadas de las proteínas L4, A10 y A17 a distintos tiempos post-infección: 25K, 4a y A17 Δ C (Fig.15). Como se observa en el panel derecho, no pudimos detectar la presencia de ninguna de estas proteínas ni en las células WT ni en las KO infectadas con NYVAC, de acuerdo con estudios previos en los que se demuestra que NYVAC no es capaz de producir algunas proteínas virales tardías en líneas no permisivas {Najera, 2006 #120}. Sin embargo, en el caso de las infecciones con los virus WR y MVA, pudimos detectar la presencia de las formas maduras procesadas correspondientes a las tres proteínas virales analizadas tanto en el caso de las células DUSP1 WT como en las células KO.

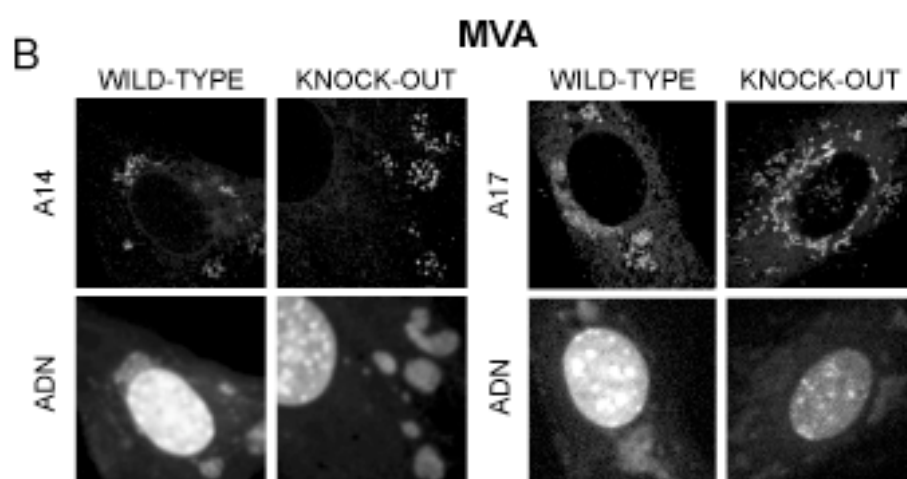
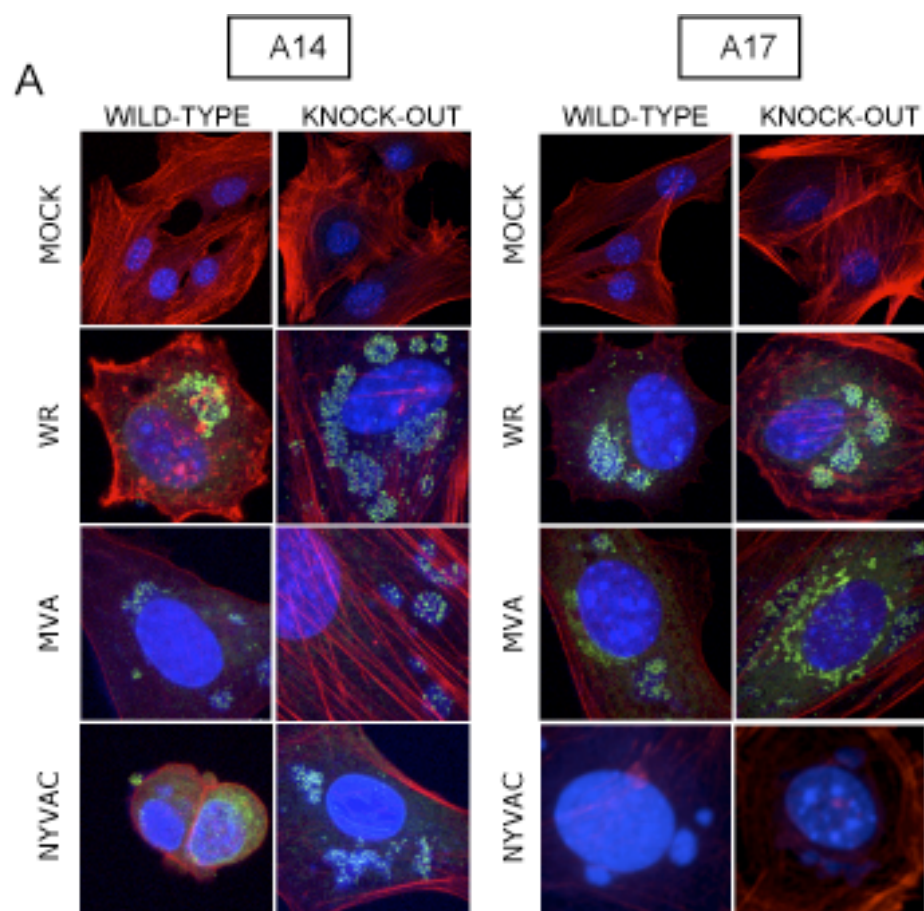


Figura 14: Análisis de la expresión de las proteínas A14 y A17 por microscopía confocal en cultivos DUSP1 WT y KO infectados con MVA. MEFs DUSP1 WT y KO se infectaron con el virus MVA a 5 UFP/cél. A las 5 h y 30 min post-infección las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas virales A14 y A17 (verde), con una sonda específica para faloidina (Moncho-Amor et al) que reconoce a la actina y con DAPI para detectar el ADN. Como control negativo se utilizaron células sin infectar (mock). Los paneles en blanco y negro muestran los marcajes por separado del ADN (núcleo y factorías virales) y las proteínas virales A14 y A17 en MEFs DUSP1 WT y KO infectados con MVA.

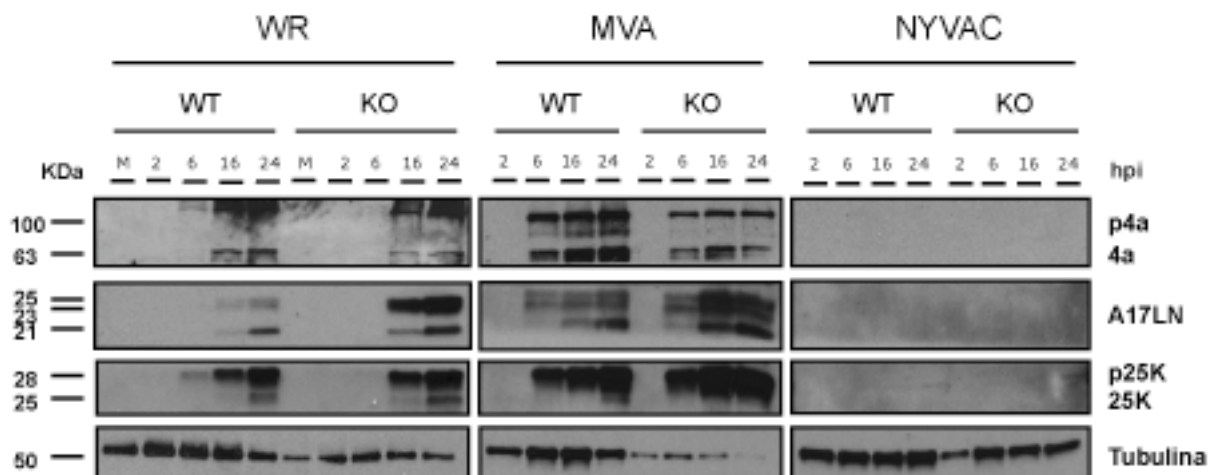


Figura 15: Análisis de la expresión de las proteínas L4, A10 y A17 en cultivos DUSP1 WT y KO durante la infección con VACV. MEFs DUSP1 WT y KO se infectaron con los virus WR, MVA o NYVAC a 5 UFP/cél. A distintos tiempos post-infección las muestras se recogieron y se analizaron cantidades equivalentes de los extractos proteicos correspondientes mediante Western-blot utilizando anticuerpos monoclonales que reconocen las proteínas virales L4, A10 y A17 y sus formas maduras correspondientes. Se utilizó la proteína celular tubulina como control de carga.

Estos resultados indican que DUSP1 no está implicado en el procesamiento proteolítico de proteínas virales durante la maduración de los viriones inmaduros.

1.3.3) DUSP1 está implicada en eventos previos a la formación del virión maduro.
Análisis de la expresión de la proteína A27 mediante microscopía confocal.

Uno de los eventos finales en el proceso de morfogénesis de VACV es la incorporación de la proteína viral tardía de membrana A27 (p14) a la envuelta del virus. Para analizar si este evento resultaba afectado por la ausencia de DUSP1, infectamos MEFs DUSP1 WT y KO con MVA a una MDI de 5 UFP/cél y analizamos mediante microscopía confocal el patrón de

expresión de A27 a las 16 hpi. Como se muestra en la Fig.16, en los MEFs WT infectados con MVA se observa un patrón de expresión de A27 claramente difuso en el citoplasma de la célula infectada, indicando que MVA es capaz de expresar A27 pero que ésta no se incorpora en la envuelta de los viriones. Sin embargo, en los MEFs KO infectados con MVA la proteína A27 presenta un patrón difuso en la región yuxtannuclear que se corresponde con la proteína recién sintetizada y un marcaje punteado que corresponde a los viriones intracelulares maduros (VMs). En los paneles inferiores de la Fig.16, se muestran ampliaciones en las que se aprecian de forma más clara los dos tipos de marcaje descritos.

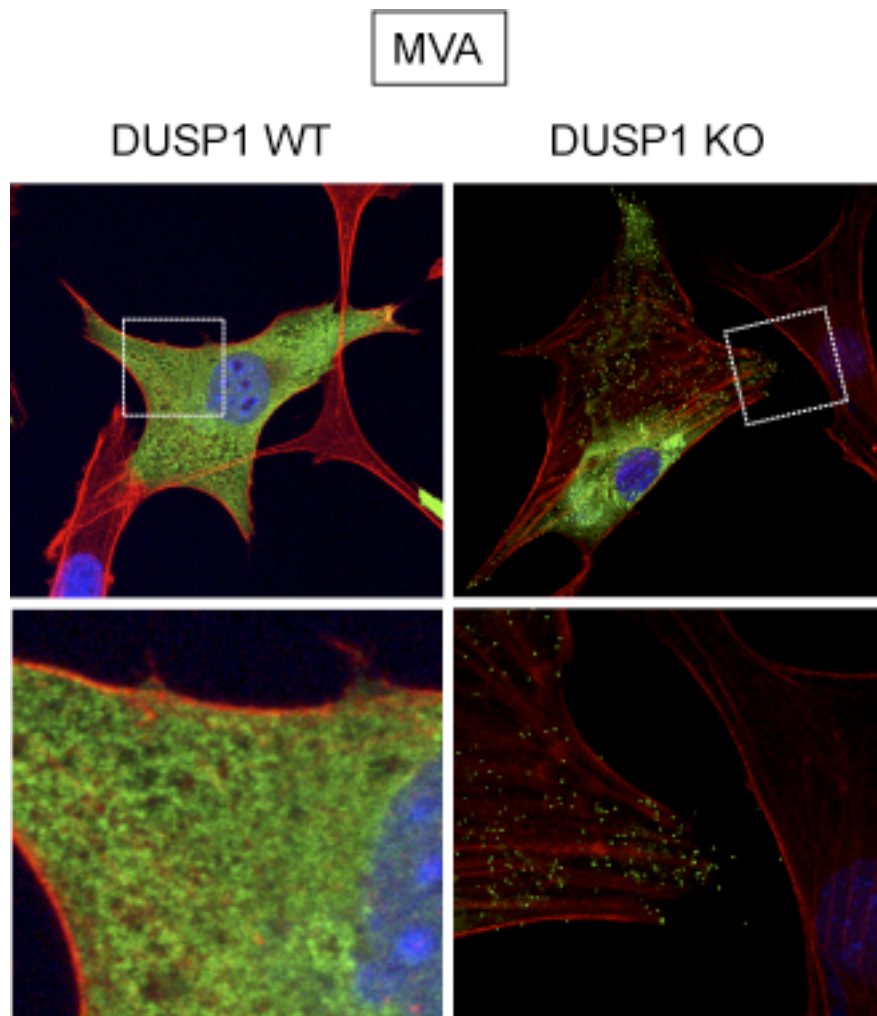


Figura 16: Análisis de la expresión de la proteína A27 por microscopía confocal en MEFs DUSP1 WT y KO infectados con MVA. MEFs DUSP1 WT y KO se infectaron con el virus MVA a una MDI de 5 UFP/cél. A las 16 hpi las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína viral A27 (verde), con una sonda específica para faloidina (Moncho-Amor et al) que reconoce a la actina y con DAPI para detectar el ADN. Los paneles inferiores representan ampliaciones (5X) de las regiones punteadas en las imágenes superiores.

Asimismo, observamos patrones de expresión de A27 similares a los de las células KO infectadas con MVA cuando inhibimos la expresión de DUSP1 en MEFs WT mediante el uso de ARNs interferentes específicos para DUSP1 de origen murino y luego infectamos las células interferidas con MVA (datos no mostrados).

Por último, quisimos analizar otro evento característico de una replicación productiva de VACV: la formación de colas de actina en las células DUSP1 WT y KO infectadas con MVA. Como se puede observar en la **Fig.17**, únicamente pudimos detectar virus maduros saliendo de la célula infectada mediante colas de actina en el caso de los MEFs DUSP1 KO infectados lo que indica que MVA es capaz de producir VEs en ausencia de DUSP1.

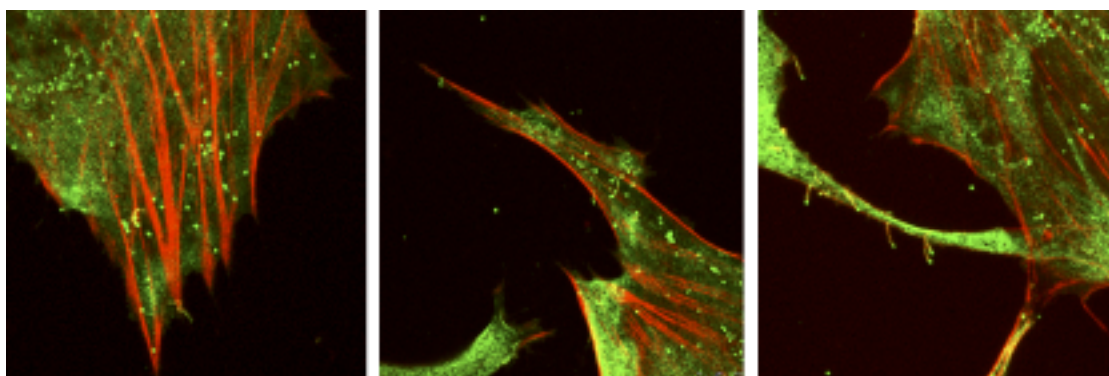


Figura 17: Formación de colas de actina en MEFs DUSP1 KO infectados con MVA. MEFs DUSP1 WT y KO se infectaron con el virus MVA a 5 UFP/cél. A las 16 hpi las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con un anticuerpo monoclonal que reconoce a la proteína viral A27 (verde), con una sonda específica para faloidina (Moncho-Amor et al) que reconoce a la actina.

Todos los resultados mostrados hasta el momento sugieren que DUSP1 está implicado en eventos que tienen lugar antes de la formación de los viriones maduros.

1.3.4) DUSP1 está implicada en la transición VIN-VM. Análisis del proceso de morfogénesis viral en presencia y ausencia de DUSP1 mediante microscopía electrónica.

Para profundizar en el estudio de la morfogénesis de MVA en ausencia de DUSP1 realizamos un ensayo de microscopía electrónica con células DUSP1 WT y KO infectadas con MVA durante 16 horas y analizamos la presencia de los distintos intermediarios virales.

En MEFs WT infectadas con MVA (Fig.18A-G) se observa la presencia de distintos intermediarios virales y formas asociadas a la infección como focos de viroplasma (V) rodeados por crestas en formación (Fig.18A), acúmulos de ADN viral (Fig.18B y C), viriones inmaduros (VI) (Fig.18A y C) y viriones inmaduros con nucleoide (VIN) (Fig.18C). Sin embargo, no detectamos la presencia de formas maduras del virus como era esperable debido al bloqueo morfogénético de MVA en la mayoría de las células de mamífero. En lugar de VMs encontramos diversos intermediarios virales de transición y formas aberrantes como las que se muestran en las Figs.18D-G: Partículas electrodensas envueltas por una membrana (Fig.18D), viriones con una formación de nucleoide incorrecta (Fig.18E), formas virales con múltiples envueltas (Fig.18F) y viriones maduros aberrantes con una condensación del core incorrecta (Fig.18G).

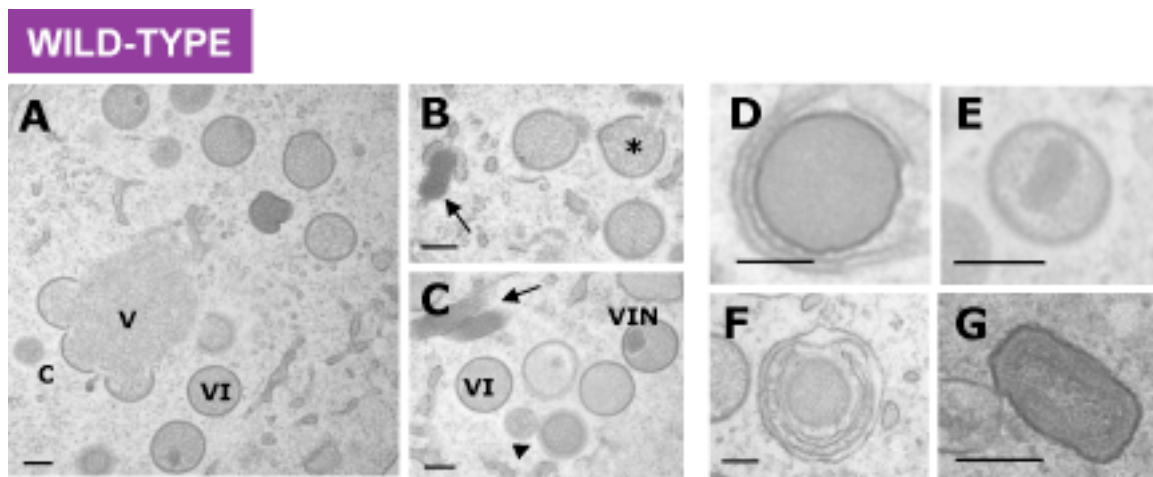


Figura 18: Análisis de los distintos intermediarios virales de MVA en presencia de DUSP1 mediante microscopía electrónica. Imágenes de microscopía electrónica de MEFs DUSP1 WT (A-G) infectados con MVA a una MDI de 5 UFP/cél. A las 16 hpi las células fueron fijadas y procesados mediante inclusión convencional en epoxi resinas como se describe en Materiales y Métodos. A) Vista general representativa de una célula WT infectada con MVA donde se observan C (crestas), V y VIs. B-C) Acumulaciones de DNA (flechas) frecuentemente delimitadas por membranas y diferentes formas virales como crestas (C), virus inmaduros (VI) y virus inmaduros con nucleoide (VIN). *Genoma viral entrando en un VI. D-E) Formas virales de transición entre VIN y VM (punta de flecha) que pueden encontrarse ocasionalmente rodeadas por una o varias membranas. F) Viri3n inmaduro con formación incorrecta de nucleoide. G) Partícula similar a un virus maduro con core no condensado. La barra localizada en la esquina inferior izquierda indica la magnificación de cada imagen (200 nM).

Por el contrario, en el caso de los MEFs KO infectados con MVA, fuimos capaces de detectar todos los intermediarios virales característicos del proceso de morfogénesis de VACV

(Figs.19A-I). Se observan focos de viroplasma rodeados de crestas (Figs.19A y C), ADN viral localizado entre membranas del retículo endoplasmático rugoso (Fig.18B), VIs (Figs.18H y J) y VINs (Fig.19C). En los paneles de las Figs.19D-I se muestran los intermediarios virales correspondientes a las formas maduras del virus y que se encuentran frecuentemente en células permisivas para la infección con MVA: Virus maduros (VM), a veces agregados o incluso envueltos en membranas (Figs.19D-F), virus maduros en el proceso de adquisición de una segunda membrana cerca del aparato de Golgi (Fig.19G), virus maduro con envuelta (VME) (Fig.19H) y virus extracelulares (VE) (Fig.19I).

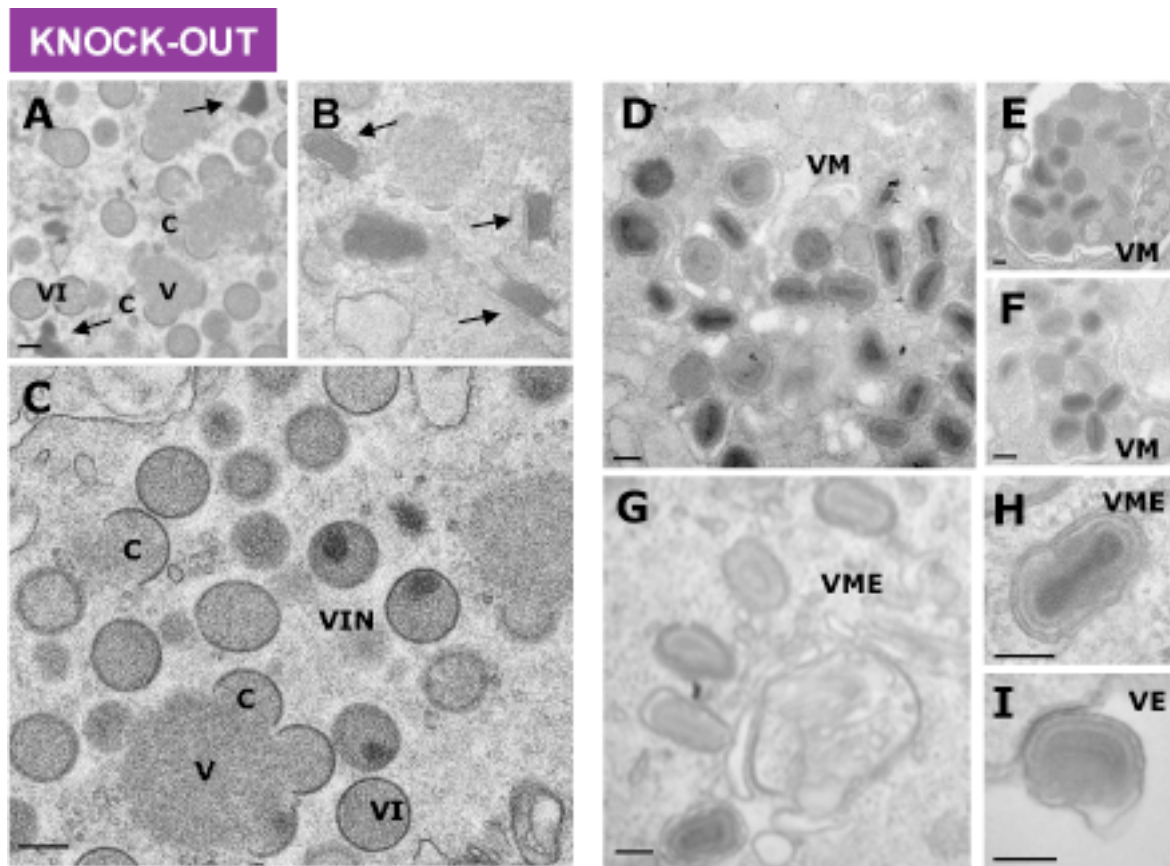


Figura 19: Análisis de los distintos intermediarios virales de MVA en ausencia de DUSP1 mediante microscopía electrónica. Imágenes de microscopía electrónica de MEFs DUSP1 KO (A-I) infectados con MVA a una MDI de 5 UFP/cél. A las 16 hpi las células fueron fijadas y procesados mediante inclusión convencional en epoxi resinas como se describe en Materiales y Métodos. A-C) Imágenes representativas de células KO infectadas con MVA dónde se aprecian acumulaciones de ADN (flechas), virus inmaduros (VIs) y virus inmaduros con nucleóide (VIN). D-F) Imágenes de virus maduros (VMs) que ocasionalmente se encuentran rodeados de membranas. G) Virus maduro adquiriendo una segunda membrana para convertirse de virus maduro con envuelta (VME). H) Virus maduro con envuelta (VME). I) Virus extracelular.

Por último, con el objetivo de caracterizar la producción de progenie viral en MEFs DUSP1 WT y KO infectadas con MVA, cuantificamos los intermediarios virales mediante el conteo de secciones de 30 células infectadas por tipo celular. En la **Tabla V** se muestra una tabla comparativa que resume los datos obtenidos. En los MEFs WT, las formas virales más abundantes son los VIs y los VINs con unos porcentajes del 80% y 16%, respectivamente. Los valores de las diferentes formas virales de los MEFs KO infectados son visiblemente distintos con un 59% de VIs, un 14% de VINs y hasta un 20% de VMs; un porcentaje equivalente al que podemos encontrar en una línea permisiva para la infección de VACV {Gallego-Gomez, 2003 #112}. Además, fuimos capaces de detectar la presencia de VMEs (4%) y VEs (2%), éste último principalmente unido a la membrana extracelular de la célula infectada.




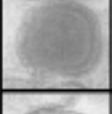

			WILD-TYPE	KNOCK-OUT
	VI	Virión Inmaduro	79,95	59,2
	VIN	Virión Inmaduro con nucleoide	16,08	14,15
	VM	Virus Maduro	3,21	19,93
	VME	Virus Maduro con envuelta	0,76	4,34
	VE	Virus Extracelular	0	2,38

Tabla V: Tabla comparativa de los intermediarios virales detectados en una infección por MVA en presencia y ausencia de DUSP1. MEFs DUSP1 WT y KO se infectaron con MVA a una MDI de 5 UFP/cél. A las 16 hpi las células fueron fijadas y se procesadas mediante inclusión convencional en epoxi resinas como se describe en Materiales y Métodos y se cuantificaron los diferentes intermediarios virales encontrados en 30 células por cada tipo celular.

El conjunto de estas observaciones indican que MVA es capaz de completar de una forma eficiente su proceso de morfogénesis en ausencia de DUSP1 y sugieren que DUSP1 desempeña un papel importante en la transición VIN-VM.

1.4) Estudio de la activación de las MAPKs durante la infección por VACV en presencia o ausencia de DUSP1.

1.4.1) *VACV induce un incremento en la activación de las MAPKs en ausencia de DUSP1.*

La unión de DUSP1 a sus ligandos p38MAPK, JNK y ERK es específica y dependiente del tipo celular analizado y de las condiciones de estimulación a las que se ve sometido el cultivo, las preferencias de unión entre estos ligandos varían. Por ello, quisimos determinar en qué medida DUSP1 afecta a la activación de unas quinasas u otras durante la infección por VACV.

Para comparar dicha activación, monocapas de MEFs WT y KO fueron infectadas con los virus WR, MVA o NYVAC a una MDI de 5 UFP/cél y se recogieron muestras del cultivo celular desde 15 min hasta 8 hpi para analizar, mediante Western-blot, la activación de las diferentes MAPKs (medida como la fosforilación de estas proteínas). Como se observa en la [Fig.20](#), los tres virus inducen la fosforilación de ERK desde los 15 min después de la infección tanto en las células WT como en la KO. Sin embargo, los niveles de fosforilación de ERK son menores en las células WT en comparación con los observados en las células KO, donde se observa una activación prolongada con un pico entre las 2 y las 4 hpi. Asimismo, podemos observar que VACV induce preferentemente la fosforilación de ERK-2.

En el caso de JNK, encontramos un patrón de activación similar, aunque no pudimos detectar fosforilación de esta quinasa a tiempos tempranos durante la infección. En ausencia de DUSP1, los MEFs infectados con WR, MVA o NYVAC presentan una elevada fosforilación de JNK a partir de las 2 hpi que se mantiene durante el período de tiempo analizado. Por otro lado, en los MEFs WT, JNK experimenta una ligera activación durante la infección con MVA y NYVAC resultando casi indetectable en la infección con WR.

A la vista de estos resultados, podemos afirmar que en respuesta a la infección con VACV, DUSP1 participa en la regulación de los niveles de fosforilación de las diferentes quinasas, pero no en el comienzo ni en la duración de la activación.

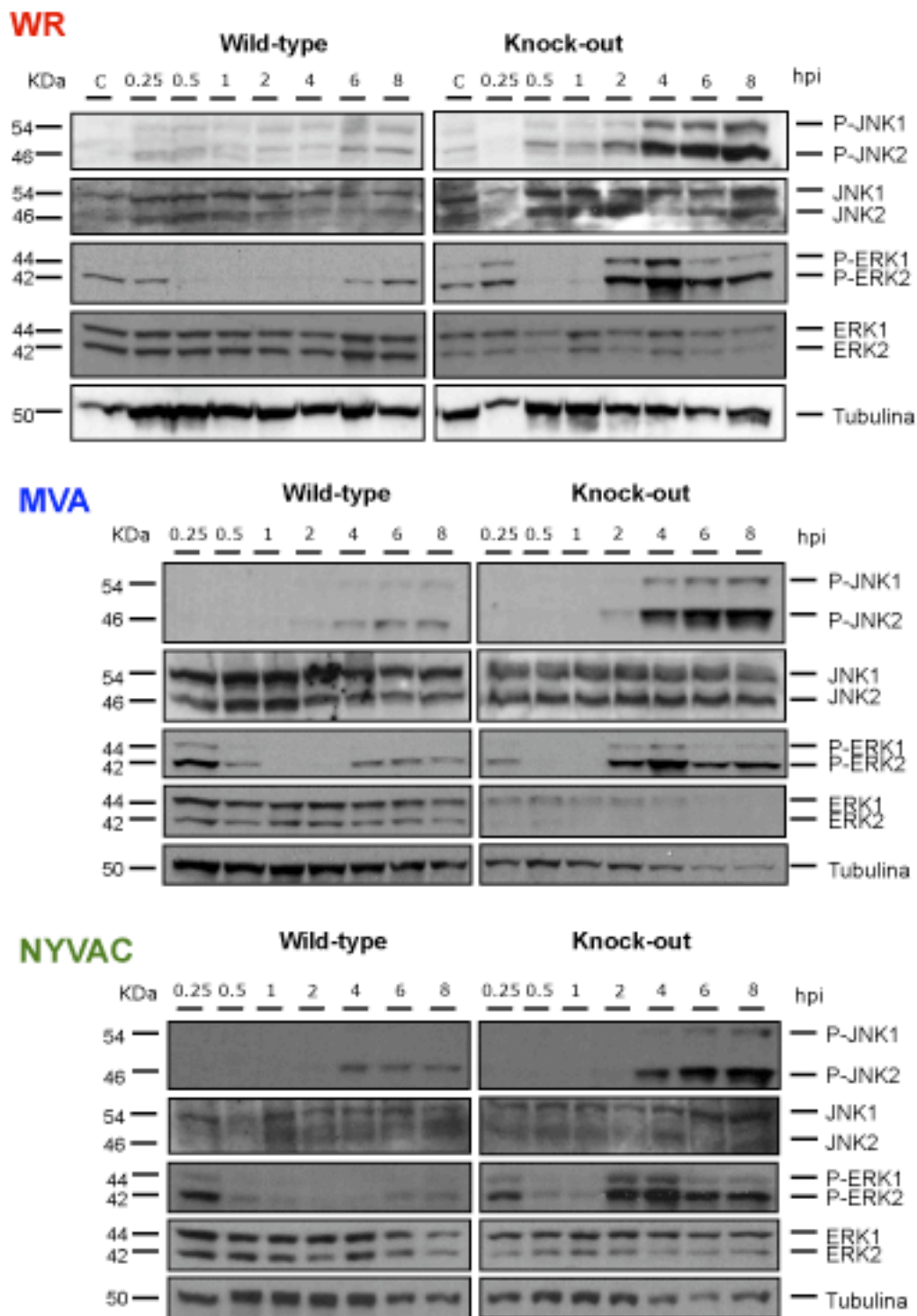


Figura 20: Análisis de la Activación de las MAPKs durante la infección de VACV en presencia y ausencia de DUSP1. MEFs DUSP1 WT y KO se infectaron con WR, MVA o NYVAC a una MDI de 5 UFP/cél. Se recogieron muestras a los tiempos post-infección indicados y se analizaron 50 µg de proteína mediante Western-blot utilizando anticuerpos específicos frente a P-ERK, ERK, P-JNK, JNK o tubulina.

1.4.2) *La activación de las MAPKs contribuye a la infección productiva de MVA en ausencia de DUSP1.*

Los resultados mostrados en el apartado anterior indican que DUSP1 regula los niveles de activación de las MAPKs en respuesta a la infección por VACV y, por lo tanto, quisimos determinar si este fenómeno tenía relación con la capacidad de MVA para completar su ciclo viral en ausencia de DUSP1.

Para analizar de forma específica la contribución de cada MAPK en la replicación de MVA en células murinas en cultivo, utilizamos los inhibidores UO126 y SB203580 que bloquean la actividad de ERK y p38MAPK, respectivamente. Descartamos el uso del inhibidor de JNK SP600125 porque se ha descrito recientemente que produce efectos negativos en la replicación de VACV independientemente de su función en el bloqueo de JNK y, por tanto, no era válido para nuestro ensayo (Pereira et al, 2012).

Se infectaron MEFs DUSP1 WT y KO con MVA y, posteriormente, se trataron con los inhibidores a distintos tiempos post-infección para analizar el efecto de dichos inhibidores sobre la replicación de MVA en presencia y ausencia de DUSP1. Dicho análisis se llevó a cabo a las 24 horas post-infección, a pesar de que las mayores diferencias en cuanto a replicación viral entre las células WT y KO infectadas con MVA fueron detectadas a las 72 hpi (Fig.11) para poder valorar mejor el efecto de los inhibidores puesto que éstos se degradan con el tiempo.

Como se puede observar en la Fig.21, se produce un descenso de entre 2 y 5 veces en la replicación de MVA en los MEFs DUSP1 KO tratadas con el inhibidor de ERK o con el inhibidor de p38MAPK en comparación con las células no tratadas y dicho fenómeno ocurría independientemente del momento en el que se añadieran los inhibidores a las células infectadas. Por otro lado, el efecto de los distintos inhibidores no es sumatorio ya que la replicación de MVA no experimenta un descenso más acusado en las células infectadas y tratadas con una mezcla de estos inhibidores que el observado en las células tratadas con cada uno de los inhibidores por separado. Por último, si comparamos las células KO infectadas con MVA y tratadas con los inhibidores con las células WT infectadas y no tratadas, podemos observar que los niveles de replicación de MVA no son equiparables. Este dato sugiere que la quinasa JNK, no inhibida en este ensayo, puede ser también parcialmente responsable de la replicación de MVA en las células KO.

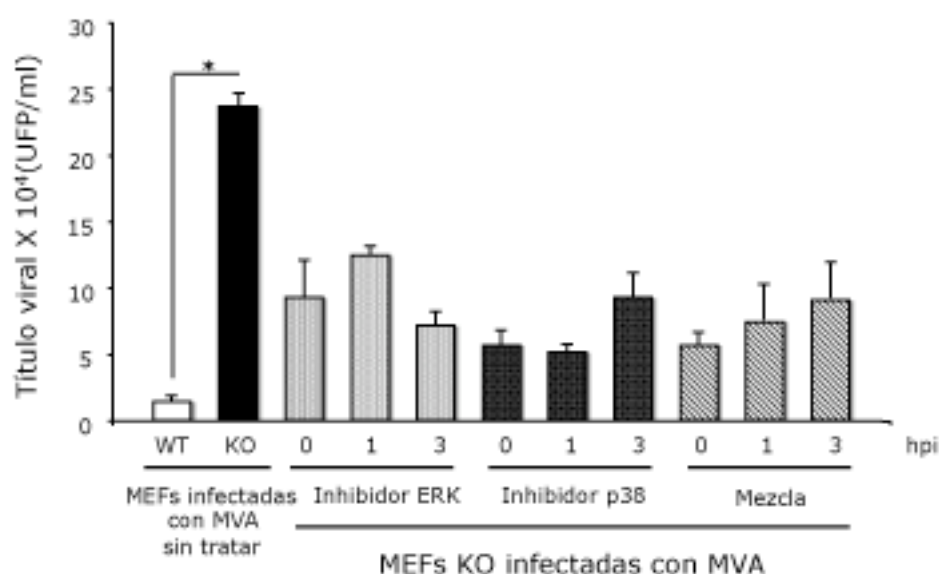


Figura 21: Efecto de los inhibidores de las MAPKs en la replicación de MVA en presencia o ausencia de DUSP1. MEFs DUSP1 WT y KO se infectaron con el virus MVA a 0,01 UFP/cél. A continuación, éstas fueron no tratadas o tratadas con el inhibidor de ERK UO126 (10 μ M / 30 min) o con el inhibidor de p38MAPK SB203580 (5 μ M / 1 h) a los tiempos post-infección. A las 24 hpi se recogieron muestras y se cuantificó la presencia de virus total mediante un ensayo de inmunotinción en células DF-1. Los valores son representativos de dos experimentos independientes.

Con estos resultados podemos concluir que la activación de las MAPKs durante la infección viral contribuye a la replicación de MVA en células murinas carentes de DUSP1.

2) Análisis de la patogenicidad y la respuesta inmune inducida por el VACV en presencia o ausencia de DUSP1 en el modelo de ratón.

2.1) Los ratones DUSP1 KO son más susceptibles a la infección por WR que los ratones WT. Análisis de la patogenicidad y del rendimiento viral mediante ruta intranasal.

Estudios previos han demostrado que DUSP1 está implicada en la eliminación del patógeno por parte del hospedador (Frazier et al, 2009). Recientemente se ha descrito el papel de DUSP1 durante la patogenicidad causada por diversas bacterias y parásitos (Rodríguez et al, 2010), (Kar et al, 2010).

No obstante, poco se sabe acerca de su papel en el contexto de una infección viral.

Con estos antecedentes y con el objetivo de conocer la función de DUSP1 durante la

infección por VACV *in vivo*, inoculamos ratones DUSP1 WT y DUSP1 KO por ruta intranasal con 5 dosis por encima o por debajo de la dosis letal 50 (LD50) para WR, 10^6 UFP/ratón. Durante el período analizado, monitorizamos diariamente el índice de mortalidad en la población y diferentes síntomas de enfermedad como la pérdida de peso, la falta de movilidad, el encorvamiento y el grado de acicalamiento (pelo erizado). Los síntomas de enfermedad se evaluaron en una escala de 0 a 3 siendo 0 el valor mínimo de enfermedad y 3 el valor máximo.

Como se puede observar en la Fig.22A, los ratones DUSP1 KO sufrieron una mayor pérdida de peso en comparación con los ratones DUSP1 WT durante el tiempo de infección analizado y para cada una de las dosis ensayadas. En concreto, la pérdida de peso alcanzó el 25% en el caso de los animales inoculados con la dosis más alta y un 21% en el caso de los que recibieron la dosis más baja. Esta susceptibilidad de los ratones DUSP1 KO frente a la infección por WR se vio también reflejada en los síntomas de enfermedad analizados durante el experimento (Fig.22B). Estos ratones fueron reduciendo su movilidad y su nivel de acicalamiento progresivamente, hecho que fue más notable a día 3 post-infección, donde se alcanzó un valor de 2,65 en la escala arbitraria 0-3 mencionada previamente. Sin embargo, los ratones DUSP1 WT sólo alcanzaron un valor de 1,2 en dicha escala, lo que representa un diagnóstico de enfermedad leve.

Si nos centramos en los grupos infectados con las dosis más altas de virus, podemos observar que los ratones DUSP1 KO sufren las primeras bajas a día 4 post-infección, cuando mueren 3 de los 5 ratones infectados. La mortalidad en este grupo alcanzó el 100% a día 6 post-infección. En el caso de los ratones DUSP1 WT no murió ningún animal hasta el día 6 post-infección y finalmente sobrevivió un 20% de la población infectada (Fig.22C).

Con el objetivo de analizar si esta susceptibilidad de los ratones DUSP1 KO frente a la infección por WR se debía a una mayor replicación viral en estos animales, decidimos inocular por ruta intranasal a ratones DUSP1 WT y KO con la dosis superior utilizada en el ensayo de patogenia (Fig.22) y analizar la replicación de WR-luc en los pulmones de los animales a días 2 y 5 post-infección. Como se muestra en la Fig.23, aunque los valores no son estadísticamente significativos, tres experimentos independientes mostraron títulos virales más altos, expresados como la actividad luciferasa presente en los pulmones de los ratones DUSP1 KO en comparación con los ratones DUSP1 WT a ambos días post-infección.

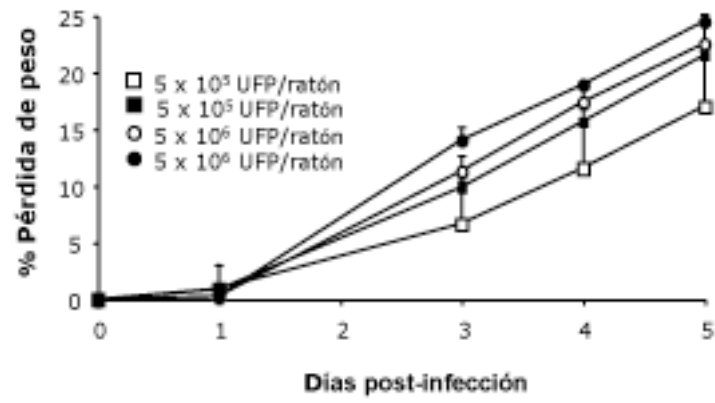
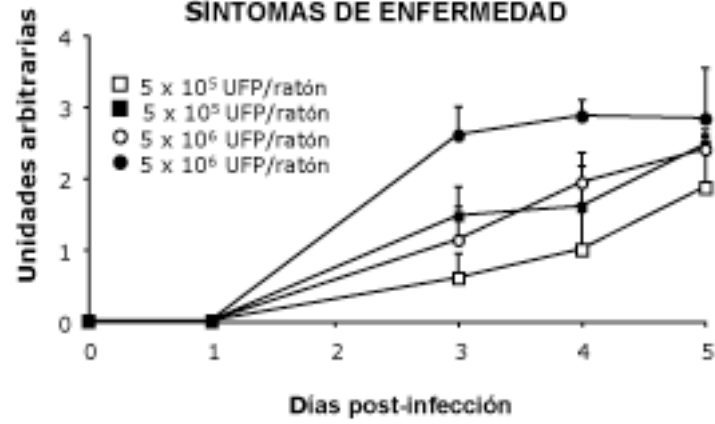
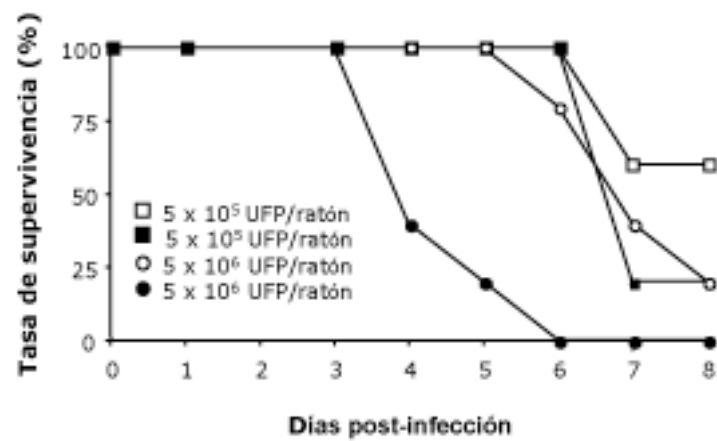
A**PÉRDIDA DE PESO****B****SÍNTOMAS DE ENFERMEDAD****C****MORTANDAD**

Figura 22: Evaluación de la patogenicia del virus WR en ratones DUSP1 WT y KO. Ratones DUSP1 WT y KO (n = 5) fueron inoculados por ruta intranasal con 5×10^5 ó 5×10^6 UFP/ratón de WR. A) La pérdida de peso fue evaluada diariamente de forma individual y se representa en la gráfica como la media del aumento de pérdida de peso en cada grupo de ratones respecto al peso inicial al comienzo del experimento. B) Los síntomas de enfermedad (movilidad reducida, erizamiento del pelo y encorvamiento) se evaluaron diariamente de forma individual utilizando un sistema de unidades arbitrarias con una escala de 0 a 3 (sano-enfermo). C) Mortalidad de los ratones representada como la tasa de supervivencia de cada grupo de ratones respecto al comienzo del experimento.

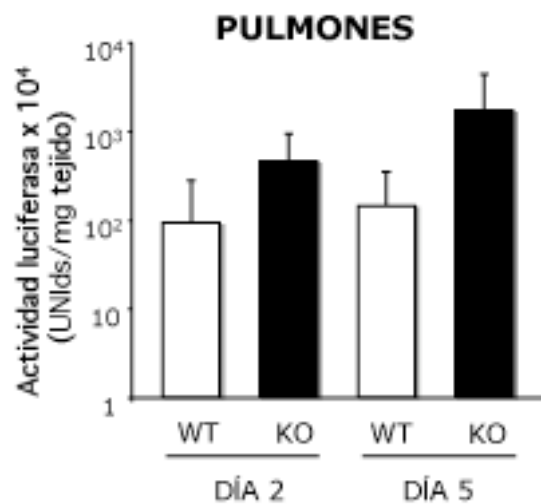


Figura 23: Rendimiento viral en pulmones de ratones DUSP1 WT y KO infectados con WR. Ratones DUSP1 WT y KO (n = 4) se inocularon por ruta intranasal con una dosis de 5×10^6 UFP/ratón de WR-luc. Posteriormente, se evaluó la actividad del gen de la luciferasa (Unidades/ mg tejido) en los pulmones de los ratones infectados mediante el ensayo de luciferasa previamente descrito en Materiales y Métodos a los 2 y 5 días post-infección. Se muestra un ejemplo representativo de tres ensayos realizados.

En conjunto, estos resultados indican que la ausencia de DUSP1 produce una mayor susceptibilidad de los ratones a la infección por el virus replicativo WR y que esta susceptibilidad es probablemente causada por una mayor replicación de WR en los pulmones de los ratones DUSP1 KO infectados en comparación con los ratones DUSP1 WT.

2.2) MVA y NYVAC no llevan a cabo infecciones productivas ni en presencia ni en ausencia de DUSP1 en el modelo murino.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* con el virus atenuado MVA, junto con el hecho de que los virus atenuados MVA y NYVAC difieren en el número y tipo de genes inmunomoduladores presentes en su genoma, quisimos analizar la replicación *in vivo* de estos virus. Con este objetivo infectamos ratones DUSP1 WT y KO con dichos virus mediante distintas rutas de inoculación.

2.2.1) Ruta intranasal e intraperitoneal.

La infección por vía intranasal con MVA o NYVAC no causó ningún síntoma de enfermedad ni en los ratones DUSP1 WT ni en los ratones DUSP1 KO. Tampoco pudimos detectar evidencias de expresión viral, evaluada mediante el ensayo de luciferasa, en los pulmones de los animales infectados (datos no mostrados).

Posteriormente, realizamos un estudio similar inoculando ratones por una ruta sistémica como es la ruta intraperitoneal. Para ello infectamos ratones DUSP1 WT y KO con una dosis de 2×10^7 UFP/ratón y recogimos a las 4 y 16 hpi muestras de aquellos órganos presentes en la cavidad peritoneal más susceptibles de ser infectados durante una inoculación intraperitoneal, según se ha descrito previamente (Gomez et al, 2007a): bazo, nódulos linfáticos, testículos y lavados peritoneales. Como puede observarse en las [Figs.24 y 25](#), ambos virus mostraron cinéticas similares y los mayores niveles de expresión de luciferasa detectados a las 4 hpi están de acuerdo con lo que se había descrito en estudios previos del laboratorio (Gomez et al, 2007a), excepto en el caso de los testículos donde la expresión se mantiene o es ligeramente más elevada a las 16 hpi. En resumen, no pudimos observar ninguna diferencia entre los ratones DUSP1 WT y DUSP1 KO infectados con MVA o NYVAC, lo que sugiere que DUSP1 no ejerce ningún papel durante la replicación *in vivo* por la ruta intraperitoneal de estos dos virus atenuados en los tiempos analizados.

2.2.2) Ruta de escarificación en la base de la cola.

Con el objetivo de analizar la infección de MVA por otra ruta cuyas dianas celulares fueran más similares a los fibroblastos murinos que utilizamos en los ensayos de infección *in vitro*, decidimos escarificar ratones DUSP1 WT y KO con 10^7 UFP/ratón de MVA y analizamos el grado de lesión a los 8 y 11 días post-inoculación. Como se muestra en la [Fig.26](#), a 8 días post-infección observamos lesiones en las colas de los ratones KO infectados que se mantuvieron hasta pasado el día 11 post-infección, mientras que estas lesiones no se manifestaron en los ratones WT infectados. Las lesiones de los ratones KO se caracterizaron por un engrosamiento del tejido conectivo objeto de la escarificación que conllevó la aparición

progresiva de un abultamiento en forma de costra, mientras que la cola de los ratones WT sólo presentaba señales del raspado asociadas a la técnica de la escarificación para eliminar el vello de la zona previa a la infección con el virus.

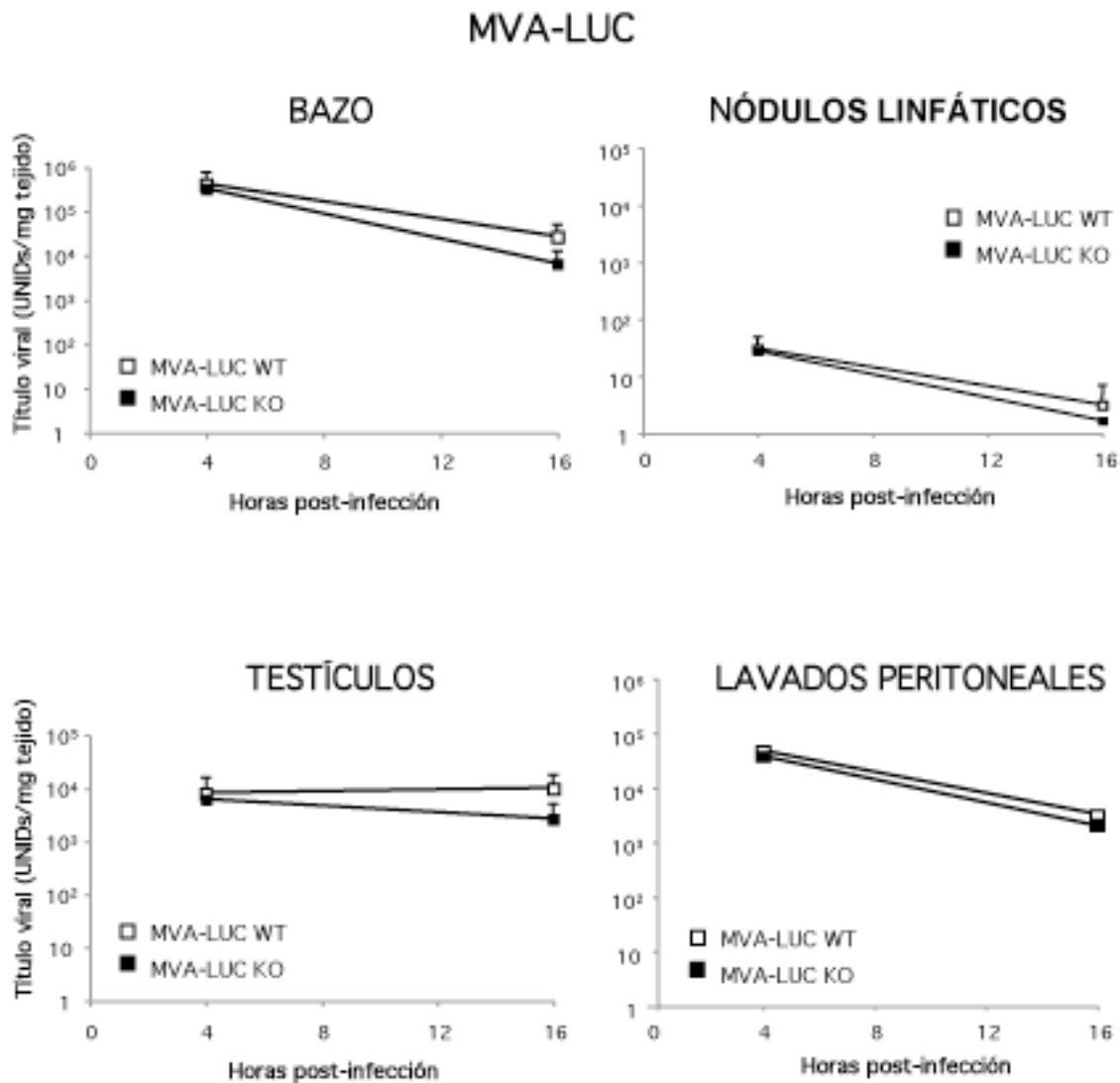


Figura 24: Determinación de los niveles de luciferasa en distintos tejidos de ratones DUSP1 WT y KO inoculados con MVA-luc. Ratones DUSP1 WT y KO (n = 4) se inocularon por ruta intraperitoneal con una dosis de 2×10^7 UFP/ratón de MVA-luc. Posteriormente, se recogieron muestras de bazo, nódulos linfáticos, testículos y lavados peritoneales a las 4 y 16 hpi y se procedió a la evaluación de la actividad luciferasa (Unidades/mg tejido), presente en los mismos, mediante el ensayo de luciferasa previamente descrito en Materiales y Metodos. Se muestra un ejemplo representativo de dos ensayos realizados.

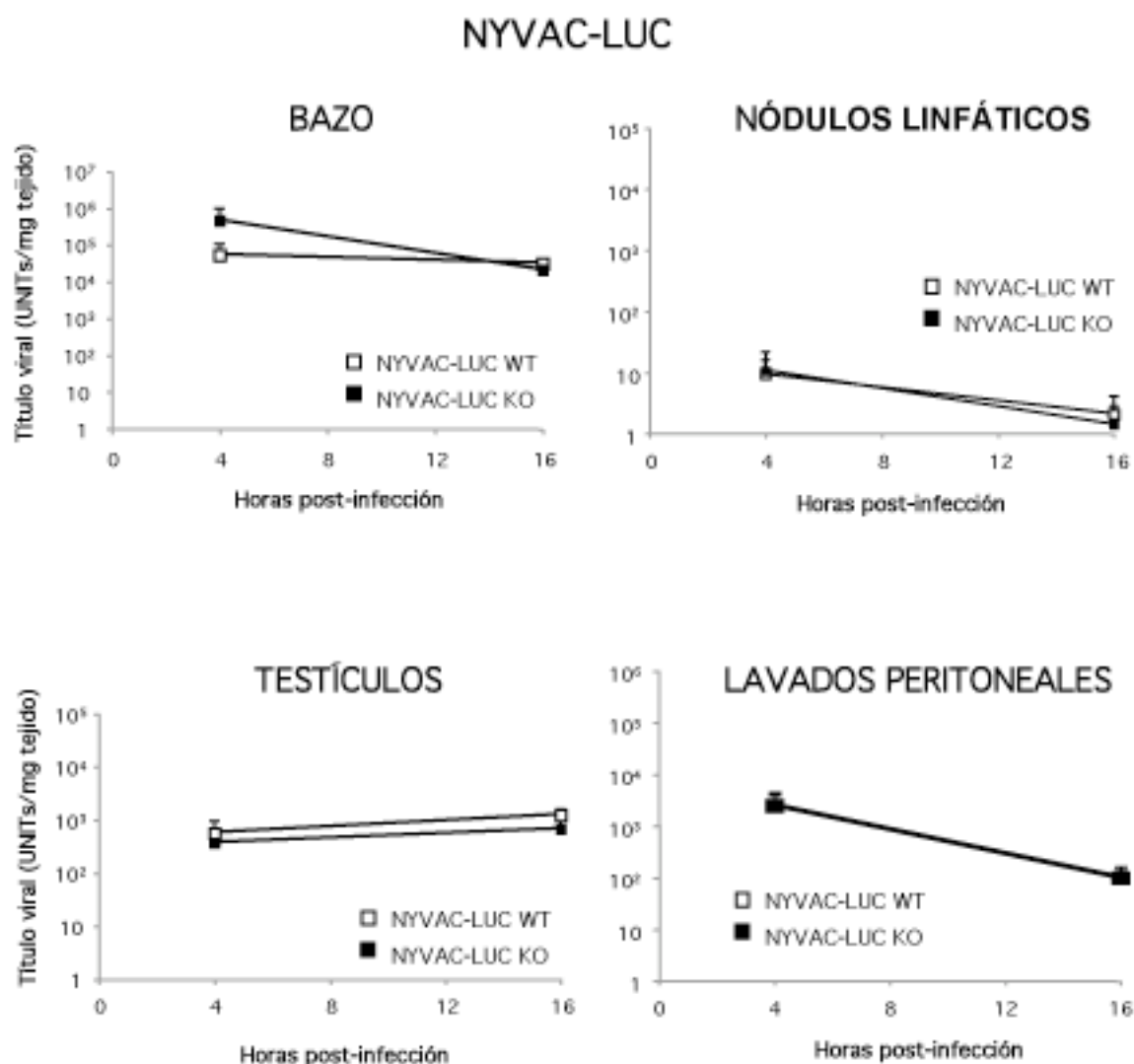


Figura 25: Determinación de los niveles de luciferasa en distintos tejidos de ratones DUSP1 WT y KO inoculados con NYVAC-luc. Ratones DUSP1 WT y KO (n = 4) se inocularon por ruta intraperitoneal con una dosis de 2×10^7 UFP/ratón de NYVAC-luc. Posteriormente, se recogieron muestras de bazo, nódulos linfáticos, testículos y lavados peritoneales a las 4 y 16 hpi y se procedió a la evaluación de la actividad del gen la luciferasa (Unidades/mg tejido) en los mismos. Se muestra un ejemplo representativo de dos ensayos realizados.

Para conocer la causa de estas lesiones, decidimos extraer muestras del tejido de la cola sometido a escarificación con MVA y determinar la presencia de virus en las muestras. No detectamos evidencias de replicación viral en ninguna de las muestras analizadas (datos no mostrados), lo que sugiere que las lesiones observadas en los ratones DUSP1 KO tras la escarificación con el virus MVA no son consecuencia de la replicación del virus, sino que

podrían ser debidas a procesos inflamatorios desencadenados durante la infección con MVA en ausencia de DUSP1.

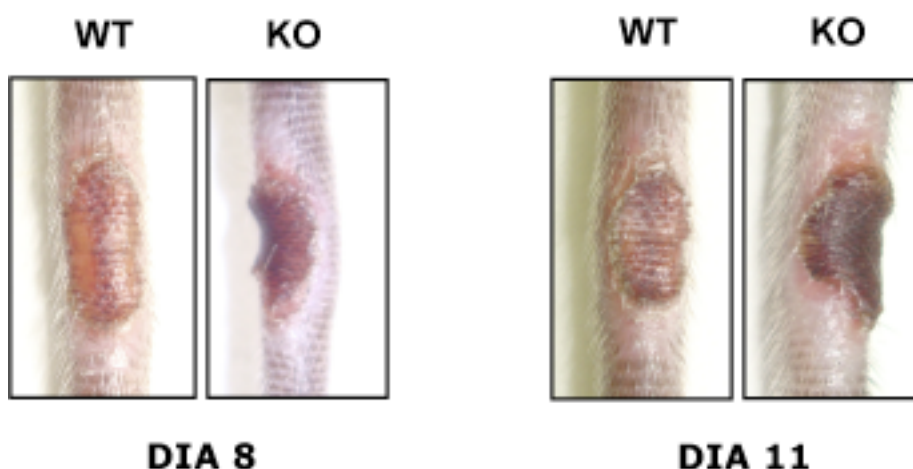


Figura 26: Lesiones en la cola de ratones DUSP1 WT y KO inoculados con MVA. Ratones DUSP1 WT y KO (n = 4) se inocularon mediante escarificación en la cola con una dosis de 10^7 UFP/ratón y la aparición de lesiones se monitorizó diariamente. En la figura se muestran imágenes representativas de colas de ratones WT y KO infectados con MVA a los 8 y 11 días post-infección. Se realizaron tres experimentos independientes.

2.3) DUSP1 está implicado en la regulación de las respuestas inmunes innata y adaptativa frente a VACV.

En la literatura reciente se describe ampliamente la función esencial de DUSP1 como regulador de la respuesta inmune inflamatoria frente a distintos estímulos (Chi et al, 2006). Se ha descrito que una respuesta inmune exacerbada, causada por la hiperfosforilación de las MAPKs en ausencia de DUSP1, puede incluso producir la muerte del hospedador (Salojin et al, 2006). Sin embargo, no existe mucha información disponible acerca del papel que DUSP1 desempeña en la respuesta inmune del hospedador durante una infección viral. Debido a esto, decidimos analizar el papel de DUSP1 en la respuesta inmune generada *in vivo* tras la infección por VACV mediante diversas rutas utilizando ratones DUSP1 WT y KO.

2.3.1) Ruta intranasal.

En primer lugar, analizamos la producción de citoquinas a tiempos tempranos después de la inoculación como medida de la respuesta inmune innata desencadenada durante la infección por VACV. Para ello, inoculamos a ratones DUSP1 WT y KO con 10^5 UFP/ratón de WR o 10^7 UFP/ratón de MVA o NYVAC y determinamos los niveles de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 en los sueros de los ratones infectados a las 3 y las 24 hpi. Seleccionamos estas citoquinas porque son aquellas que se inducen con mayor frecuencia en ausencia de DUSP1 en respuesta a otros estímulos (Chi et al, 2006). Alternativamente, determinamos los niveles de dichas citoquinas en lavados broncoalveolares de ratones DUSP1 WT y KO infectados con las mismas dosis de los tres virus a las 3 y las 24 hpi. No fuimos capaces de detectar la producción de IL-6, TNF- α , IL-1 β ni IL-10 en los sueros o los lavados broncoalveolares de los ratones infectados a ninguno de los tiempos post-infección analizados.

A continuación, y debido a que la respuesta inmune adaptativa llevada a cabo por las células T es importante en la defensa del hospedador frente a una infección con VACV, quisimos analizar si DUSP1 desempeña algún papel en dicha respuesta. Para ello inoculamos ratones DUSP1 WT y KO con 10^5 UFP/ratón de WR o 10^7 UFP/ratón de MVA o NYVAC y determinamos el porcentaje de las células T CD8 específicas para el péptido E3.

La inmunización por vía intranasal mostró diferencias en la magnitud (Fig.27A) de la respuesta T CD8⁺ específica para E3 obtenida y determinada como la suma de los porcentajes de células T CD8⁺ secretoras de IFN- γ y/o IL-2 y/o TNF- α , que es significativamente mayor en los ratones DUSP1 KO infectados con los tres virus y cuantitativamente mayor en el caso de la infección con WR. La respuesta de las células T CD8⁺ específicas para el péptido E3 es polifuncional (Fig.27B) y está representada mayoritariamente por células T CD8⁺ triples positivas, dobles positivas para TNF- α e IFN- γ y positivas para IFN- γ .

2.3.2) Ruta intraperitoneal.

Quisimos analizar también la producción de citoquinas a tiempos tempranos después de la inoculación intraperitoneal para evaluar la respuesta inmune innata desencadenada durante la infección por VACV por una ruta sistémica. Para ello, inoculamos ratones DUSP1 WT y KO por vía intraperitoneal con 10^7 UFP/ratón de WR ó 2×10^7 UFP/ratón de MVA o NYVAC y analizamos la producción de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 a las 3 y 24 h.p.i.

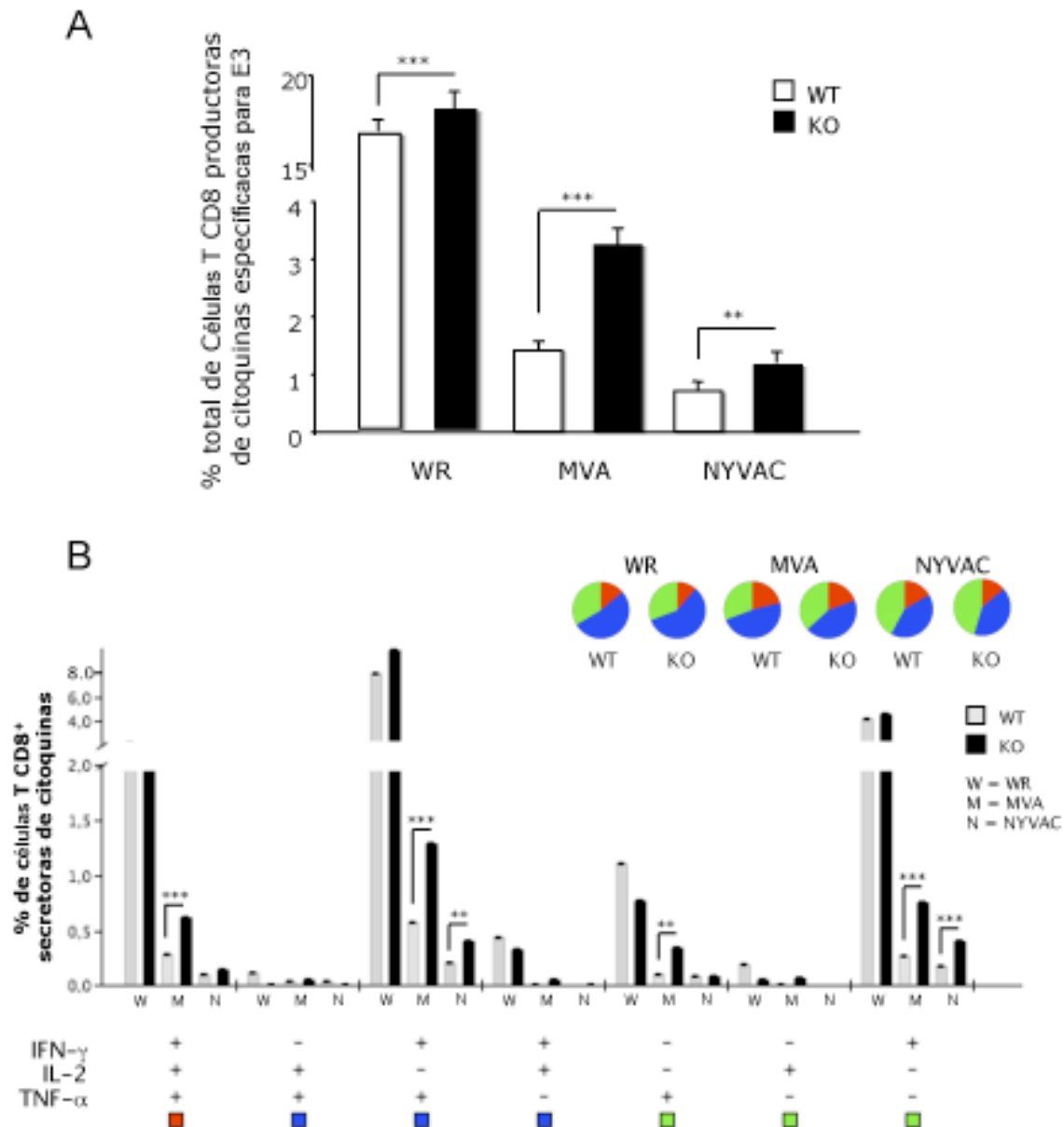


Figura 27: Respuesta de células T CD8 VACV-específicas en ratones DUSP1 WT y KO inoculados por ruta intranasal con VACV. Ratones DUSP1 WT y KO ($n = 3$) se inocularon por vía intranasal con una dosis de 10^5 UFP/ratón de WR o una dosis de 5×10^7 UFP/ratón de MVA o NYVAC. La respuesta T CD8 E3-específica fue analizada a los 10 días post-inoculación tras la estimulación de los esplenocitos procedentes de animales infectados con el péptido viral E3. A) Magnitud de la respuesta T CD8 específica para E3. Los valores representan la suma de los porcentajes de células T CD8 positivas que secretan IL-2 y/o TNF- α y/o IFN- γ . Los valores obtenidos en las muestras sin estimular fueron sustraídos en todos los casos. B) Perfil funcional de las respuestas T CD8 específicas para E3. Todas las posibles combinaciones de las respuestas se muestran en el eje x y los porcentajes relativos de las distintas poblaciones celulares dentro de la respuesta total T CD8 se muestran en el eje y. Las distintas respuestas aparecen agrupadas según un código de colores en base al número de funciones.

Como puede observarse en la Fig.28, en el caso de la inoculación con WR se produce una inducción muy reducida de citoquinas tanto en los ratones WT como en los KO. Sin embargo, la inoculación con MVA o NYVAC desencadenó la expresión de IL-6, TNF- α e IL-10, siendo esta inducción mayor en el caso de los ratones KO. Asimismo, podemos observar diferencias tanto en los niveles de expresión de las citoquinas como en los tiempos de expresión de las mismas entre los ratones KO infectados con MVA o NYVAC, de manera que detectamos los mayores niveles de expresión de las citoquinas analizados tras la infección por NYVAC a las 3 hpi y tras la infección por MVA a las 24 hpi. Este hecho era esperable ya que estos dos virus atenuados difieren en el número y el tipo de genes inmunomoduladores presentes en sus genomas (Najera et al, 2006).

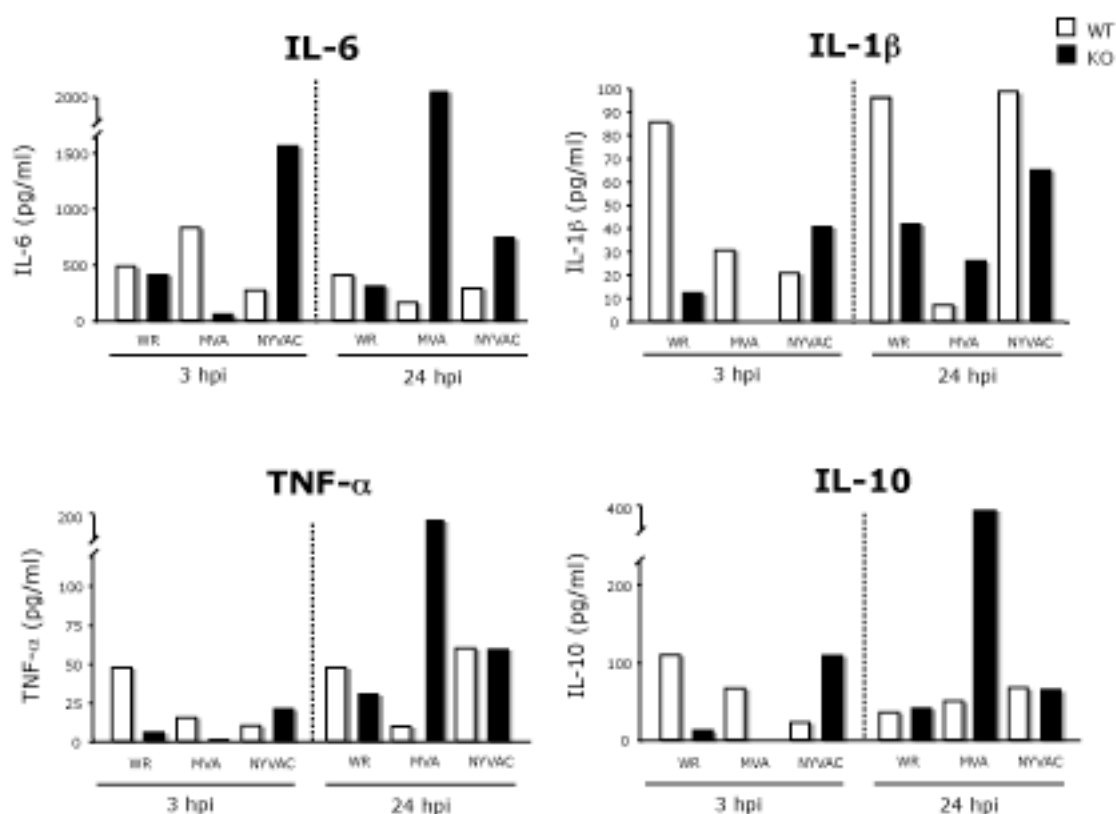


Figura 28: Producción de citoquinas a tiempos tempranos en ratones DUSP1 WT y KO infectados por VACV. Ratones DUSP1 WT y KO (n = 3) se inocularon por vía intraperitoneal con una dosis de 10^7 UFP/ratón de WR o 2×10^7 UFP/ratón de MVA o NYVAC. A las 3 y 24 hpi se extrajo sangre de los ratones infectados y se analizó la producción de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 en sueros de ratones mediante la tecnología de LUMINEX. En la gráfica se muestra un ejemplo representativo de tres experimentos independientes realizados.

En este caso también quisimos analizar la respuesta inmune adaptativa generada tras la infección por VACV por la vía intraperitoneal y para ello inoculamos ratones DUSP1 WT y KO con las mismas dosis utilizadas para analizar la producción de citoquinas y analizamos a 10 días post-infección la respuesta de células T específicas para VACV determinando el patrón de producción de IFN- γ , IL-2 y TNF- α de esplenocitos estimulados con el péptido inmunodominante de VACV, E3.

Como se muestra en la Fig.29A, la magnitud de la respuesta T CD8⁺ específica para E3 obtenida es significativamente mayor en los ratones DUSP1 KO infectados con los tres virus y cuantitativamente mayor en las inoculaciones con WR o NYVAC. En este caso, la magnitud observada en la inoculación con NYVAC es superior a la de MVA, en contraposición con la magnitud que detectábamos durante en la inoculación por vía intranasal. Además, la respuesta inmune antígeno-específica desencadenada por la infección con los tres virus es altamente polifuncional y está representada mayoritariamente por células triples positivas y dobles positivas para TNF- α e IFN- γ (Fig.29B).

En resumen, los resultados del análisis de producción de citoquinas y de la respuesta de células T CD8 E3-específicas generadas en ratones DUSP1 WT y KO infectados con VACV indican que DUSP1 podría estar implicado en la regulación de las respuestas inmunes innata y adaptativa durante la infección por VACV.

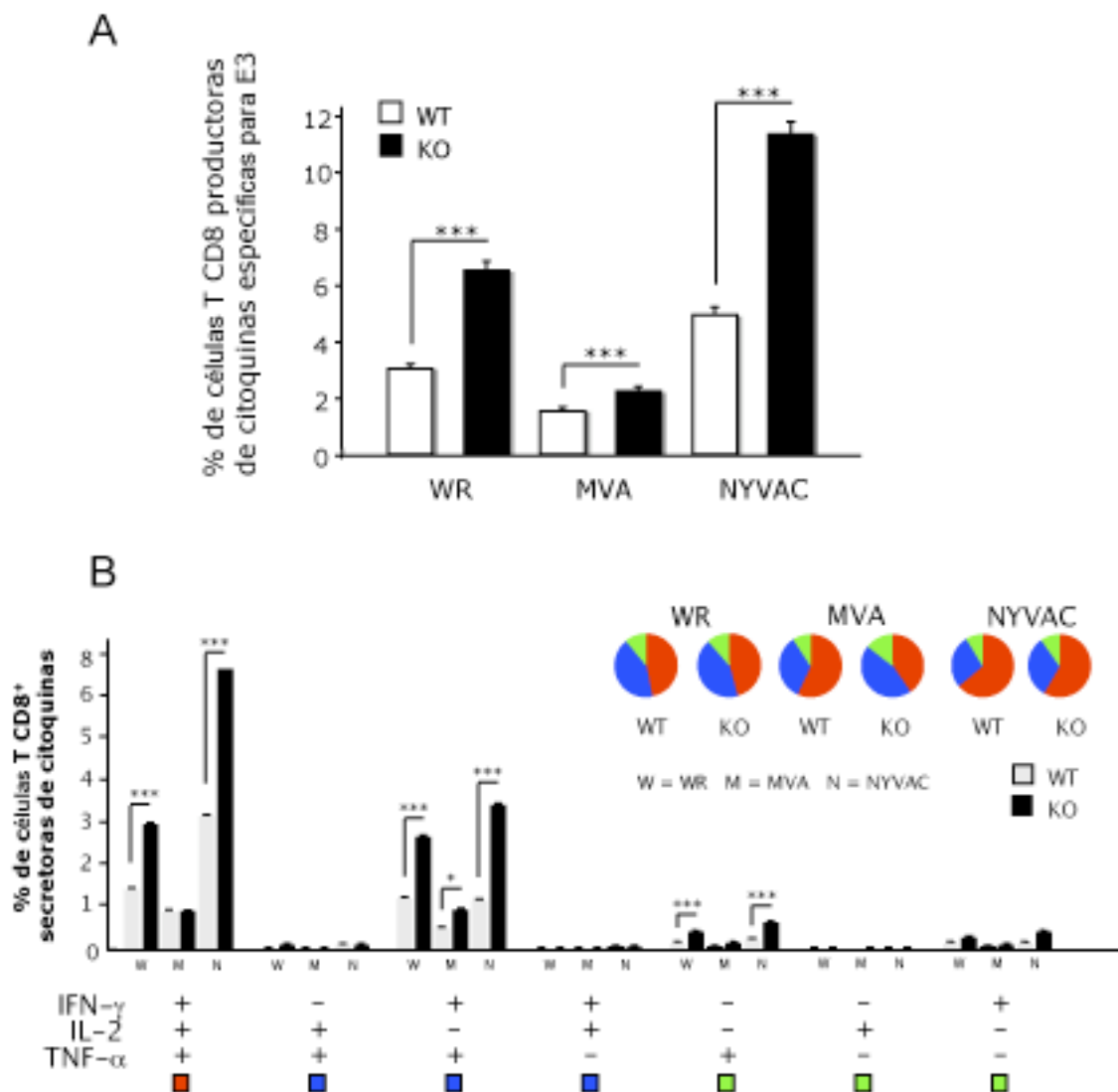


Figura 29: Respuesta inmune adaptativa de células T CD8 VACV-específica en ratones DUSP1 WT y KO inoculados por ruta intraperitoneal con VACV. Ratones DUSP1 WT y KO ($n = 3$) se inocularon por vía intraperitoneal con una dosis de 10^7 UFP/ratón de WR y 2×10^7 UFP/ratón de MVA o NYVAC. La respuesta T CD8 E3-específica fue analizada a los 10 días post-inoculación tras la estimulación con el péptido viral E3 de los esplenocitos procedentes de animales infectados. A) Magnitud de la respuesta T CD8 específica para E3. Los valores representan la suma de los porcentajes de células T CD8 positivas que secretan IL-2 y/o TNF- α y/o IFN- γ . Los valores obtenidos en las muestras sin estimular fueron sustraídos en todos los casos. B) Perfil funcional de las respuestas T CD8 específicas para E3. Todas las posibles combinaciones de las respuestas se muestran en el eje x y los porcentajes relativos de las distintas poblaciones celulares dentro de la respuesta total T CD8 se muestran en el eje y. Las distintas respuestas aparecen agrupadas según un código de colores en base al número de funciones.

VI. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los poxvirus son capaces de modular diversos eventos intracelulares con el objetivo de llevar a cabo una infección productiva. Se han descrito al menos cuatro de éstos factores: el control del ciclo celular, el linaje celular junto con el estado de diferenciación celular, los factores celulares de complementación y las rutas de señalización (McFadden, 2005). Entre las cascadas de señalización reguladas por VACV se encuentra la ruta mediada por las MAPKs, en la que participa la fosfatasa dual DUSP1.

Actualmente, existe poca información disponible sobre el posible papel de la fosfatasa celular DUSP1 durante una infección viral. En el presente trabajo, hemos analizado la función de DUSP1 durante la infección por el virus vaccinia y, en concreto, hemos estudiado el efecto de dicha fosfatasa sobre la replicación, el rango de hospedador así como sobre la respuesta antiviral del hospedador. Para ello, hemos utilizado tanto células murinas en cultivo como el modelo *in vivo* de ratón.

En los análisis *in vitro* hemos observado que VACV modula de manera específica tanto la transcripción de ARNm de DUSP1 como su expresión. Sin embargo, existen diferencias en los niveles de inducción producidos por cada uno de los virus ensayados, siendo el virus atenuado NYVAC el que produce una mayor inducción tanto transcripcional como proteica de DUSP1. Debido al gran número de genes de VACV implicados en la evasión del sistema inmune del hospedador y a la presencia diferencial de éstos en los genomas de WR, MVA o NYVAC, el efecto de cada uno de ellos sobre la ruta de los TLR y, consecuentemente, sobre la inducción de DUSP1 es forzosamente distinto.

Existen publicaciones previas que han demostrado que VACV produce la activación de ERK, de forma que el virus promueve un contexto de crecimiento celular normal y de esta forma consigue una replicación viral eficiente en las células infectadas (Andrade et al, 2004), (Santos et al, 2006), (Schweneker et al, 2012). En el presente trabajo hemos demostrado que la activación de ERK mediada por VACV es la responsable del aumento de la vida media de DUSP1, descartando la posibilidad de que esta fosforilación estuviese mediada por una quinasa viral.

En los análisis de replicación viral en células en cultivo, observamos diferencias

significativas durante la infección por WR o MVA en los MEFs DUSP1 KO en comparación con los MEFs WT. En concreto, detectamos un aumento significativo de un log en el caso de la infección por WR que se mantiene en todos los tiempos post-infección analizados. Esta diferencia en replicación es todavía mayor en el caso de la infección por MVA, lo que constituye un hecho especialmente relevante ya que MVA no es capaz de llevar a cabo una infección productiva en la mayoría de células de mamífero, incluyendo las líneas celulares murinas (Drexler et al, 1998), (Verheust et al, 2012). Se ha descrito que una línea celular puede ser o no permisiva a una infección viral dependiendo no tanto de los receptores de membrana que median su entrada, sino de los eventos intracelulares que tienen lugar una vez que el virus se encuentra dentro de la célula. Por ejemplo, VACV es capaz de penetrar en las células de insecto pero es incapaz de completar su ciclo infectivo en las mismas (Li et al, 1998). Debido a esto, las cascadas de señalización intracelular implicadas en la transmisión de señales procedentes de la superficie celular desempeñan un papel esencial en las infecciones virales. Muchas de estas rutas de señalización se regulan mediante la fosforilación y consecuente activación de sus componentes, por lo que la fosforilación de componentes tanto celulares como virales es un proceso importante que utilizan numerosos virus durante su replicación (Jan et al, 2012), (Bretana et al, 2012).

En este sentido, el presente trabajo demuestra que la ausencia de la fosfatasa DUSP1 se traduce en un cambio en el rango de hospedador del virus atenuado MVA. Este resultado puede estar relacionado con los cambios en el patrón de fosforilación de las MAPKs, ligandos específicos de DUSP1, observados durante la infección por MVA en ausencia de DUSP1. Debido a esto, decidimos analizar si la inactivación de ERK y p38MAPK podía tener una implicación directa en la infección productiva de MVA en MEFs DUSP1 KO. En dicho experimento de inhibición observamos una reducción en los títulos virales en las células KO infectadas y tratadas con los inhibidores en comparación con las células KO infectadas sin tratar, lo que sugiere que las MAPKs están implicadas en la permisividad de los MEFs KO para la infección por MVA que observamos. Sin embargo, esta reducción en el título viral no es equiparable a los títulos virales obtenidos en los MEFs WT infectados con MVA, lo que sugiere que la quinasa JNK debe ejercer también un papel en la infección de MVA en ausencia de DUSP1. Del mismo modo, la combinación de los inhibidores de ERK y p38MAPK no ejerce un

efecto sinérgico puesto que los títulos virales de MVA obtenidos en este caso no son menores en comparación con los detectados utilizando los inhibidores individualmente. Este hecho puede ser debido a la compleja interacción existente entre los distintos componentes de la ruta de las MAPKs, de manera que para un proceso determinado varias ramas pueden ejercer una función redundante siendo capaces de suplir la función de otra rama en caso de inactivación de la misma, o incluso pueden ejercer distintas funciones, ya sean opuestas o complementarias en un determinado proceso celular y así contribuir al resultado final de dicho proceso.

Las MAPKs pueden estar implicadas en una serie de funciones en el contexto de la infección por MVA (Fig.30). Por un lado, la capacidad de MVA de llevar a cabo una infección productiva en los MEFs KO puede ser debida a la acción de las MAPKs sobre determinadas fosfoproteínas virales. Se ha descrito que VACV utiliza la fosforilación como mecanismo para regular la actividad de varias de sus proteínas (Condit et al, 2006). La mayoría de ellas son fosforiladas por las quinasas virales B1 y F10 (Lin et al, 1992), (Wang & Shuman, 1995) pero otras son fosforiladas por quinasas celulares (Condit et al, 2006). Muchas de estas fosfoproteínas desempeñan un papel importante durante el proceso de morfogénesis de VACV (Mercer & Traktman, 2003), (Derrien et al, 1999), (Resch et al, 2005), (Beaud et al, 1995). En la Tabla VI se muestran las proteínas virales implicadas en morfogénesis susceptibles de ser fosforiladas. Sin embargo, de acuerdo con los resultados que hemos obtenido en el presente trabajo analizando la expresión de las proteínas virales A14, A17 y A27 mediante microscopía confocal, analizando el procesamiento proteolítico de las proteínas virales L4, A10 y A17 por Western-blot y analizando la presencia de estudios de intermediarios virales en los MEFs WT y KO mediante microscopía electrónica, que nos indican que el bloqueo en la morfogénesis de MVA en MEFs WT tiene lugar a nivel de la formación del virión maduro al igual que ocurre en células HeLa (Gallego-Gomez et al, 2003), sólo algunas de estas proteínas virales podrían ser candidatas a estar implicadas en este proceso. Por lo tanto, sería posible que el estado de fosforilación de las proteínas A13, F17 y A4, implicadas en la transición VIN-VM, esté afectado en ausencia de DUSP1 durante la infección por MVA y este hecho tenga una repercusión importante en el proceso de morfogénesis viral. Además, las MAPKs presentan distintos niveles de expresión e incluso se pueden encontrar unas isoformas u otras de dichas quinasas

dependiendo del tipo celular. Por ejemplo, se ha descrito que las células de pollo sólo expresan la isoforma ERK2, pero no ERK1 (Xing et al, 2009). Por tanto, es posible que una expresión diferencial de uno o varios de los componentes de las MAPKs entre distintos tipos celulares contribuya al rango de hospedador de un virus determinado. En esta línea, existen estudios recientes que demuestran que la inactivación de la ruta mediada por ERK durante la infección por WR en líneas permisivas se traduce en una disminución de los títulos virales (Andrade et al, 2004), mientras que la inactivación de ERK2 en la línea permisiva para la infección de MVA, CEF, no tiene ningún efecto en la productividad de la infección (Schweneker et al, 2012).

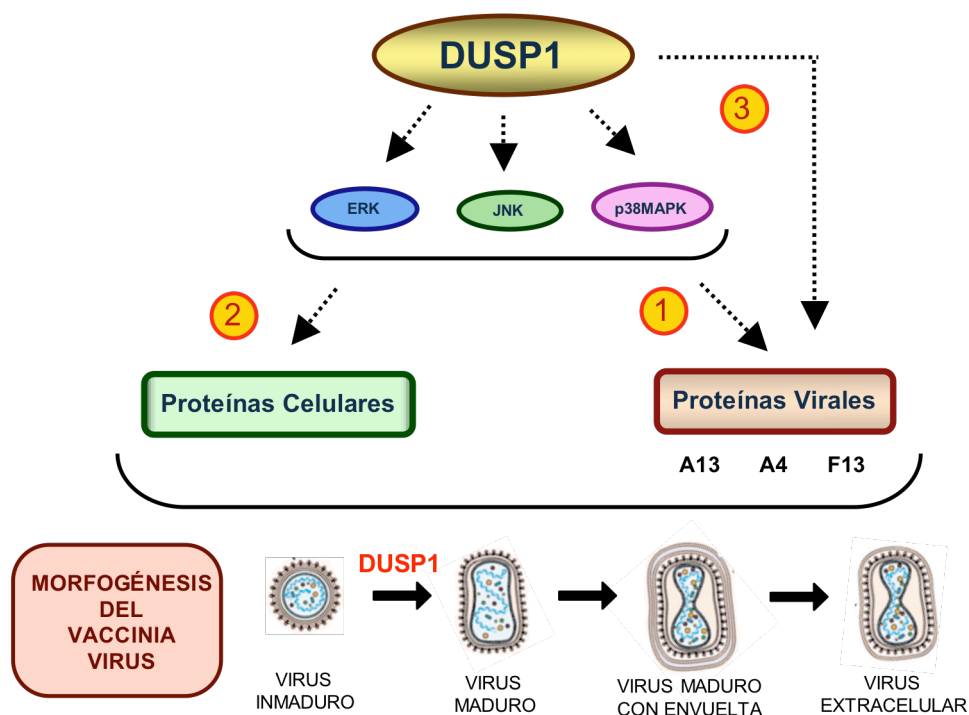


Figura 30: Esquema de las posibles funciones de DUSP1 en la infección de células murinas por MVA. 1) Acción indirecta de DUSP1 a través las MAPKs sobre fosfoproteínas virales. 2) Acción indirecta de DUSP1 a través de las MAPKs sobre proteínas celulares. 3) Acción directa de DUSP1 sobre fosfoproteínas virales.

Por otro lado, las MAPKs pueden estar actuando sobre ligandos celulares promoviendo cambios en su estabilización, activación y localización subcelular. De esta manera, la hiper-

fosforilación de las MAPKs y sus sustratos en ausencia de DUSP1 durante la infección por MVA podría estar desregulando estos procesos celulares de tal manera que MVA fuera capaz de completar su ciclo viral en células murinas

A pesar de que los ensayos de inhibición de MAPKs que hemos realizado apuntan a una implicación directa de estas quinasas en la capacidad de MVA de completar su ciclo viral en MEFs KO, habría que considerar la posibilidad de que DUSP1 pueda defosforilar también residuos presentes en fosfoproteínas virales (Tabla VI). De esta forma, la actividad de dichas proteínas virales se vería alterada en ausencia de DUSP1 y de alguna manera esto favoreciese el proceso de morfogénesis de MVA. Sin embargo, este fenómeno es altamente improbable debido a varias razones. En primer lugar, porque se ha demostrado que DUSP1 presenta una elevada especificidad de sustrato y su actividad catalítica aumenta de manera dosis-dependiente al unirse a ellos (Slack et al, 2001). Por tanto, si DUSP1 defosforilara alguna proteína viral, éstas deberían presentar dominios específicos de unión similares a los dominios CD que poseen las MAPKs y que permiten la unión específica de DUSP1 a las mismas. Sin embargo, mediante ensayos *in silico* no hemos podido detectar la presencia de dominios “tipo”-CD en las fosfoproteínas A13, F17 y A4. Estudios previos han demostrado que a pesar de la alta homología de secuencia entre los dominios catalíticos de DUSP1 y la proteína viral H1, responsable de defosforilar STAT1 y bloquear la respuesta mediada por IFN. DUSP1 no es capaz de unirse a STAT1 (Mann et al, 2008) y, por tanto, no desempeña ningún papel directo en la señalización mediada por IFN. En segundo lugar, a pesar de que algunos autores han descrito que DUSP1 puede desarrollar su actividad en el citoplasma (Rosini et al, 2004), (Huang & Fan, 2002), DUSP1 es una fosfatasa principalmente nuclear, por lo que si ejerciese algún papel *in situ* durante la morfogénesis viral, tendría que permanecer secuestrada en el citoplasma de la célula infectada. Por último, considerando que el virus salvaje WR es capaz de llevar a cabo una infección productiva tanto en los MEFs WT como en los MEFs KO, alcanzando mayores títulos virales en ausencia de DUSP1, la posibilidad de que el virus promueva el secuestro de DUSP1 en el citoplasma en beneficio propio parece aún más improbable.

Proteína	Localización	Fosforilación	
A11	Ausente	F10-indep.	CR
A17	Membrana	F10-dep.	CR
A14	Membrana	F10-dep.	CR
A13	Membrana	F10-indep.	VI
H5	Core	Cell, B1, F10-dep.	CR
A30	Core	F10-dep.	Vle
G7	Core	F10-indep.	Vle
F17	Core	Partially F10-dep.	Vla
A4	Core	F10-dep.	VIN
E8	Core	????	VE

Tabla VI: Esquema de las fosfoproteínas virales implicadas en el proceso de morfogénesis. Localización, quinasa responsable de su fosforilación y evento en el que participan de las fosfoproteínas virales implicadas en morfogénesis.

Recientemente se han publicado numerosos artículos sobre el papel que ejerce DUSP1 en la respuesta inmune del hospedador frente a diversos patógenos (Chi et al, 2006), (Salojin et al, 2006), (Hammer et al, 2006), (Cortes-Sempere et al, 2009) pero no existen estudios que aborden de manera directa la función de DUSP1 en la respuesta inmune antiviral. Por ello, consideramos interesante analizar la implicación de DUSP1 en la patogenicidad y en la respuesta inmune innata y adaptativa durante la infección *in vivo* por VACV utilizando el modelo de ratón.

Cuando inoculamos ratones DUSP1 WT y KO con el virus WR por ruta intranasal para evaluar la patogenicidad producida por el virus, observamos un incremento de la pérdida de peso, una tasa de mortalidad superior y, en general, un peor diagnóstico de enfermedad en los ratones DUSP1 KO en comparación con los ratones WT. Teniendo en cuenta que DUSP1 participa en la regulación de la respuesta inmune del hospedador frente a distintos estímulos, una de las posibles causas de esta mayor susceptibilidad de los ratones KO frente a la

infección por WR podría ser una producción exacerbada de citoquinas pro-inflamatorias; sin embargo, no observamos niveles detectables de estas citoquinas ni en el suero ni en los pulmones de los animales WT o KO infectados lo que, por otra parte, era un resultado esperable debido a la gran batería de genes virales implicados en contrarrestar la respuesta antiviral del hospedador que posee WR (Seet et al, 2003), (Stanford et al, 2007). Por lo tanto, la mayor susceptibilidad de los ratones KO frente a la infección por WR podría explicarse por la mayor replicación viral observada en los pulmones de los ratones KO infectados por WR con respecto a los ratones WT. Sin embargo, con los virus atenuados MVA y NYVAC sucede lo contrario, ya que se observa un incremento en la producción de citoquinas en los ratones DUSP1 KO en comparación con los ratones WT tanto en la infección por MVA como por NYVAC, mientras que no pudimos detectar indicios de replicación en los tejidos analizados por ninguna de las dos rutas de inoculación analizadas (intranasal e intraperitoneal). No obstante, los niveles de citoquinas detectados en los sueros de los ratones DUSP1 KO infectados con NYVAC están aumentados con respecto a los ratones DUSP1 WT a las 3 hpi mientras que en el caso de los ratones infectados con MVA este incremento en la producción de citoquinas se produce a las 24 hpi. Esta diferencia en la cinética de producción de citoquinas entre ambos virus puede ser debida al diferente patrón de genes inmunomoduladores presentes o ausentes en los genomas de MVA y NYVAC, lo que se traduce en perfiles de inmunogenicidad diferente que pueden afectar a la ruta de señalización de las MAPKs de forma diferente (Najera et al, 2006). De hecho, VACV posee varias proteínas implicadas en la regulación de la ruta de las MAPKs: A46, A52, E3 y M2. En concreto, A46 secuestra a las moléculas adaptadoras MyD88, TRIF, MAL y TRAM, A52 se une a IRAK-2 y TRAF-6, E3 bloquea la acción del ARNdc, de PKR y de ARNasaL y M2 inhibe la activación de NFκB mediada por ERK2. Tanto MVA como NYVAC expresan las proteínas tempranas A46 y E3 pero no M2. Sin embargo, MVA tiene fragmentado el gen *A52R* mientras que NYVAC lo conserva intacto (Antoine et al, 1998). Estas diferencias entre ambos virus en combinación con otras delecciones en los genomas de MVA o NYVAC, como puede ser el gen *N2L* (ausente en NYVAC) perteneciente a la familia de las proteínas de tipo Bcl-2 (Gonzalez & Esteban, 2010) y de función desconocida, podrían ser responsables de las diferencias en temporalidad en la producción de citoquinas.

En la respuesta inmune adaptativa, las MAPKs participan en la expansión clonal de los

linfocitos B y T a través de la regulación de procesos tales como la producción de citoquinas, la proliferación celular y la supervivencia (Rincon & Pedraza-Alva, 2003). Por tanto, en el presente trabajo nos planteamos la posibilidad de que DUSP1, como regulador clave de la función de las MAPKs, pudiera desempeñar un papel importante en la respuesta inmune adaptativa antiviral del hospedador por lo que decidimos caracterizar dicha respuesta durante la infección por VACV tanto por vía intranasal como intraperitoneal mediante tinción intracelular de citoquinas y análisis por citometría de flujo. Los resultados obtenidos indicaron que la respuesta específica frente al antígeno viral E3 fue mayor en los esplenocitos de los ratones DUSP1 KO infectados que en los ratones DUSP1 WT infectados, lo que indica que DUSP1 está implicado en la respuesta inmune adaptativa durante la infección por VACV. No obstante, la magnitud de la respuesta obtenida para cada virus es diferente.

Teniendo en cuenta que en la inoculación intranasal con WR detectamos mayores títulos virales en los ratones DUSP1 KO, la cantidad de antígeno viral producido es mayor y su expresión se mantiene durante un período de tiempo mas prolongado en el organismo de los ratones KO infectados que en el de los WT, por lo que la respuesta inmune adaptativa se ve incrementada. Sin embargo, debido a que los virus atenuados MVA y NYVAC no son capaces de replicar *in vivo*, la mayor respuesta CD8 específica observada en los ratones KO con respecto a los WT podría estar relacionada en parte con las diferencias detectadas en la respuesta inmune innata desencadenada por ambos virus, lo que a su vez puede ser consecuencia de los distintos genes inmunomoduladores presentes en sus genomas (Najera et al, 2006), (Gomez et al, 2007b). Por otro lado, se ha descrito que cada ruta de inoculación produce una activación de las células T CD8 diferencial (Takamura et al, 2010), (Liu et al, 2010). Esto es debido a las propiedades específicas que presentan las células del sistema inmune según su localización anatómica como, por ejemplo, los macrófagos (Paulnock, 1992). Este hecho puede contribuir a explicar las variaciones en la magnitud de la respuesta T CD8 que observamos con cada virus en las distintas rutas de inoculación analizadas.

Además, el tipo de respuesta adaptativa generada también esta condicionada por la respuesta inmune innata desencadenada frente a un estímulo determinado (Iwasaki & Medzhitov, 2010). Las células dendríticas (CDs) forman parte del sistema inmune innato del hospedador constituyendo una de las primeras líneas de defensa frente a patógenos al igual

que desempeñan un papel muy importante en la relación entre las respuestas innata y adaptativa del hospedador (Iborra et al, 2012), (Huang et al, 2012), (Pulendran & Ahmed, 2006) . En este sentido, se ha descrito recientemente que DUSP1 tiene un papel esencial en la integración de las señales recibidas por las CDs y la respuesta inmune mediada por células T, de manera que contribuye a la inmunopatología y a la generación de protección frente a infecciones por bacterias y parásitos (Huang et al, 2011a). Por tanto, es posible que la ausencia de DUSP1 en las células que participan en la respuesta inmune innata del hospedador junto con el efecto de la presencia diferencial de genes inmunomoduladores en los genomas de WR, MVA y NYVAC sobre dichas células, sea la causa de las variaciones observadas en la respuesta desarrollada por las células T durante la infección por VACV.

En resumen, el estudio llevado a cabo en esta tesis doctoral es el primero en el que se analiza en detalle el papel de DUSP1 durante la infección por VACV.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La infección por el virus vaccinia incrementa la expresión de la fosfatasa celular DUSP1, tanto a nivel de ARN mensajero como a nivel de proteína, siendo necesaria la síntesis de proteínas tempranas del virus para dicha inducción.
2. El virus vaccinia induce la fosforilación de las serinas 359 y 364 de DUSP1, regulando su vida media, a través de la activación de la quinasa celular ERK.
3. El virus atenuado MVA es capaz de infectar de manera productiva las células murinas en ausencia de DUSP1. Los ensayos de inhibición de las MAPKs demuestran la contribución de éstas en este cambio en el rango de hospedador del virus MVA.
4. Los análisis por microscopía confocal y microscopía electrónica de fibroblastos murinos inmortalizados salvajes o carentes de DUSP1 demuestran que DUSP1 juega un papel importante en la transición entre las formas virales VIN y VM durante el proceso de morfogénesis viral.
5. En la infección de WR *in vivo* mediante ruta intranasal, la ausencia de DUSP1 se traduce en un aumento de la susceptibilidad de los ratones a la infección por el virus salvaje y esta susceptibilidad puede estar relacionada con los mayores títulos virales encontrados en los pulmones de los ratones KO en comparación con los ratones WT.
6. Los análisis de producción de citoquinas en sueros de animales salvajes o carentes de DUSP1 infectados por el virus vaccinia por ruta intraperitoneal demuestran que DUSP1 participa en la regulación de la respuesta inmune innata antiviral durante la infección por el virus vaccinia.
7. Los ensayos de marcaje intracelular de citoquinas y análisis por citometría de flujo sobre esplenocitos de animales salvajes o carentes de DUSP1 infectados por WR, MVA o NYVAC

tanto por ruta intranasal como por ruta intraperitoneal demuestran que la magnitud de la respuesta T CD8⁺ específica para el péptido viral E3 es significativamente mayor en los ratones carentes de DUSP1 infectados con cada uno de los tres virus en comparación con los ratones salvajes.

8. El conjunto de pruebas bioquímicas, genéticas e inmunológicas demuestran que DUSP1 juega un papel importante en el mecanismo de defensa del hospedador frente a la infección por el virus vaccinia.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Adler KB, Fischer BM, Wright DT, Cohn LA, Becker S (1994) Interactions between respiratory epithelial cells and cytokines: relationships to lung inflammation. *Ann N Y Acad Sci* **725**: 128-145

Andrade AA, Silva PN, Pereira AC, De Sousa LP, Ferreira PC, Gazzinelli RT, Kroon EG, Ropert C, Bonjardim CA (2004) The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. *Biochem J* **381**(Pt 2): 437-446

Antoine G, Scheifflinger F, Dorner F, Falkner FG (1998) The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* **244**(2): 365-396

Arakawa Y, Cordeiro JV, Schleich S, Newsome TP, Way M (2007) The release of vaccinia virus from infected cells requires RhoA-mDia modulation of cortical actin. *Cell Host Microbe* **1**(3): 227-240

Assarsson E, Greenbaum JA, Sundstrom M, Schaffer L, Hammond JA, Pasquetto V, Oseroff C, Hendrickson RC, Lefkowitz EJ, Tschärke DC, Sidney J, Grey HM, Head SR, Peters B, Sette A (2008) Kinetic analysis of a complete poxvirus transcriptome reveals an immediate-early class of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(6): 2140-2145

Bacus SS, Gudkov AV, Lowe M, Lyass L, Yung Y, Komarov AP, Keyomarsi K, Yarden Y, Seger R (2001) Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. *Oncogene* **20**(2): 147-155

Beattie E, Kauffman EB, Martinez H, Perkus ME, Jacobs BL, Paoletti E, Tartaglia J (1996) Host-range restriction of vaccinia virus E3L-specific deletion mutants. *Virus Genes* **12**(1): 89-94

Beaud G, Beaud R, Leader DP (1995) Vaccinia virus gene H5R encodes a protein that is phosphorylated by the multisubstrate vaccinia virus B1R protein kinase. *J Virol* **69**(3): 1819-1826

Bermudez O, Pages G, Gimond C (2010) The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**(2): C189-202

Betakova T, Wolffe EJ, Moss B (1999) Regulation of vaccinia virus morphogenesis: phosphorylation of the A14L and A17L membrane proteins and C-terminal truncation of the A17L protein are dependent on the F10L kinase. *J Virol* **73**(5): 3534-3543

Bisht H, Brown E, Moss B (2010)
) Kinetics and intracellular location of intramolecular disulfide bond formation mediated by the cytoplasmic redox system encoded by vaccinia virus. *Virology* **398**(2): 187-193

Blasco R, Moss B (1991) Extracellular vaccinia virus formation and cell-to-cell virus transmission are prevented by deletion of the gene encoding the 37,000-Dalton outer envelope protein. *J Virol* **65**(11): 5910-5920

Bokemeyer D, Sorokin A, Yan M, Ahn NG, Templeton DJ, Dunn MJ (1996) Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by the stress-activated protein kinase signaling pathway but not by extracellular signal-regulated kinase in fibroblasts. *J Biol Chem* **271**(2): 639-642

Bordo D, Bork P (2002) The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep* **3**(8): 741-746

Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65**(4): 663-675

Boutros T, Chevet E, Metrakos P (2008a) Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev* **60**(3): 261-310

Boutros T, Nantel A, Emadali A, Tzimas G, Conzen S, Chevet E, Metrakos PP (2008b) The MAP kinase phosphatase-1 MKP-1/DUSP1 is a regulator of human liver response to transplantation. *Am J Transplant* **8**(12): 2558-2568

Bretana NA, Lu CT, Chiang CY, Su MG, Huang KY, Lee TY, Weng SL (2012) Identifying protein phosphorylation sites with kinase substrate specificity on human viruses. *PLoS One* **7**(7): e40694

Broyles SS (2003) Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol* **84**(Pt 9): 2293-2303

Byrd CM, Hruby DE (2006) Vaccinia virus proteolysis--a review. *Rev Med Virol* **16**(3): 187-202

Cairns J (1960) The initiation of vaccinia infection. *Virology* **11**: 603-623

Cao W, Bao C, Padalko E, Lowenstein CJ (2008) Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling. *J Exp Med* **205**(6): 1491-1503

Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**(1): 50-83

Caunt CJ, Keyse SM (2012) Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J*

Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P (2007) ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1299-1310

Chen P, Li J, Barnes J, Kokkonen GC, Lee JC, Liu Y (2002) Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol* **169**(11): 6408-6416

Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD (2000) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor

stimulation. *Mol Cell* **5**(6): 905-915

Chi H, Barry SP, Roth RJ, Wu JJ, Jones EA, Bennett AM, Flavell RA (2006) Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2274-2279

Chi H, Flavell RA (2008) Acetylation of MKP-1 and the control of inflammation. *Sci Signal* **1**(41): pe44

Christen L, Higman MA, Niles EG (1992) Phenotypic characterization of three temperature-sensitive mutations in the vaccinia virus early gene transcription initiation factor. *J Gen Virol* **73** (Pt 12): 3155-3167

Condit RC, Moussatche N, Traktman P (2006) In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Adv Virus Res* **66**: 31-124

Cortes-Sempere M, Chattopadhyay S, Rovira A, Rodriguez-Fanjul V, Belda-Iniesta C, Tapia M, Cejas P, Machado-Pinilla R, Manguan-Garcia C, Sanchez-Perez I, Nistal M, Moratilla C, de Castro-Carpeno J, Gonzalez-Baron M, Albanell J, Perona R (2009) MKP1 repression is required for the chemosensitizing effects of NF-kappaB and PI3K inhibitors to cisplatin in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* **286**(2): 206-216

Coulombe P, Meloche S (2007) Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1376-1387

Cuenda A, Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1358-1375

Cyrklaff M, Risco C, Fernandez JJ, Jimenez MV, Esteban M, Baumeister W, Carrascosa JL (2005) Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 2772-2777

Dales S (1965) Replication of Animal Viruses as Studied by Electron Microscopy. *Am J Med* **38**: 699-715

Dales S, Mosbach EH (1968) Vaccinia as a model for membrane biogenesis. *Virology* **35**(4): 564-583

Dales S, Pogo BG (1981) Biology of poxviruses. *Virol Monogr* **18**: 1-109

Dallo S, Esteban M (1987) Isolation and characterization of attenuated mutants of vaccinia virus. *Virology* **159**(2): 408-422

Davies MV, Chang HW, Jacobs BL, Kaufman RJ (1993) The E3L and K3L vaccinia virus gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms. *J Virol* **67**(3): 1688-1692

Delaloye J, Roger T, Steiner-Tardivel QG, Le Roy D, Knaup Reymond M, Akira S, Petrilli V, Gomez CE, Perdiguero B, Tschopp J, Pantaleo G, Esteban M, Calandra T (2009) Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the

NALP3 inflammasome. *PLoS Pathog* **5**(6): e1000480

Derrien M, Punjabi A, Khanna M, Grubisha O, Traktman P (1999) Tyrosine phosphorylation of A17 during vaccinia virus infection: involvement of the H1 phosphatase and the F10 kinase. *J Virol* **73**(9): 7287-7296

Domingo-Gil E, Gonzalez JM, Esteban M (2010) Identification of cellular genes induced in human cells after activation of the OAS/RNaseL pathway by vaccinia virus recombinants expressing these antiviral enzymes. *J Interferon Cytokine Res* **30**(3): 171-188

Dong C, Davis RJ, Flavell RA (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* **20**: 55-72

Dorfman K, Carrasco D, Gruda M, Ryan C, Lira SA, Bravo R (1996) Disruption of the erp/mkp-1 gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts. *Oncogene* **13**(5): 925-931

Drexler I, Heller K, Wahren B, Erfle V, Sutter G (1998) Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J Gen Virol* **79** (Pt 2): 347-352

Duric V, Banasr M, Licznarski P, Schmidt HD, Stockmeier CA, Simen AA, Newton SS, Duman RS (2010) A negative regulator of MAP kinase causes depressive behavior. *Nat Med* **16**(11): 1328-1332

Engelstad M, Smith GL (1993) The vaccinia virus 42-kDa envelope protein is required for the envelopment and egress of extracellular virus and for virus virulence. *Virology* **194**(2): 627-637

Esteban M (1984) Defective vaccinia virus particles in interferon-treated infected cells. *Virology* **133**(1): 220-227

Esteban M, Flores L, Holowczak JA (1977) Topography of vaccinia virus DNA. *Virology* **82**(1): 163-181

Fenner FN, J.H. (1988) Laboratory diagnosis of infectious diseases: principles and practise. *Springer-Verlag, New York*: 177-220

Franklin CC, Kraft AS (1997) Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J Biol Chem* **272**(27): 16917-16923

Frazier WJ, Wang X, Wancket LM, Li XA, Meng X, Nelin LD, Cato AC, Liu Y (2009) Increased inflammation, impaired bacterial clearance, and metabolic disruption after gram-negative sepsis in Mkp-1-deficient mice. *J Immunol* **183**(11): 7411-7419

Gaestel M (2008) Specificity of signaling from MAPKs to MAPKAPKs: kinases' tango nuevo. *Front Biosci* **13**: 6050-6059

Gallego-Gomez JC, Risco C, Rodriguez D, Cabezas P, Guerra S, Carrascosa JL, Esteban M (2003) Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and

other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells. *J Virol* **77**(19): 10606-10622

Garcia AD, Aravind L, Koonin EV, Moss B (2000) Bacterial-type DNA holliday junction resolvases in eukaryotic viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16): 8926-8931

Garcia-Arriaza J, Najera JL, Gomez CE, Tewabe N, Sorzano CO, Calandra T, Roger T, Esteban M (2011) A candidate HIV/AIDS vaccine (MVA-B) lacking vaccinia virus gene C6L enhances memory HIV-1-specific T-cell responses. *PLoS One* **6**(8): e24244

Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, Davis SW, Winslow JP, Paoletti E (1990) The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* **179**(1): 247-266, 517-263

Gomez CE, Najera JL, Domingo-Gil E, Ochoa-Callejero L, Gonzalez-Aseguinolaza G, Esteban M (2007a) Virus distribution of the attenuated MVA and NYVAC poxvirus strains in mice. *J Gen Virol* **88**(Pt 9): 2473-2478

Gomez CE, Najera JL, Jimenez EP, Jimenez V, Wagner R, Graf M, Frachette MJ, Liljestrom P, Pantaleo G, Esteban M (2007b) Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1BX08 gp120 and HIV-1(IIIB) Gag-Pol-Nef proteins of clade B. *Vaccine* **25**(15): 2863-2885

Gomez CE, Najera JL, Krupa M, Esteban M (2008) The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther* **8**(2): 97-120

Gomez CE, Najera JL, Krupa M, Perdiguero B, Esteban M (2011a) MVA and NYVAC as vaccines against emergent infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther* **11**(3): 189-217

Gomez CE, Najera JL, Perdiguero B, Garcia-Arriaza J, Sorzano CO, Jimenez V, Gonzalez-Sanz R, Jimenez JL, Munoz-Fernandez MA, Lopez Bernaldo de Quiros JC, Guardo AC, Garcia F, Gatell JM, Plana M, Esteban M (2011b) The HIV/AIDS vaccine candidate MVA-B administered as a single immunogen in humans triggers robust, polyfunctional, and selective effector memory T cell responses to HIV-1 antigens. *J Virol* **85**(21): 11468-11478

Gonzalez JM, Esteban M (2010) A poxvirus Bcl-2-like gene family involved in regulation of host immune response: sequence similarity and evolutionary history. *Virol J* **7**: 59

Griffiths G, Roos N, Schleich S, Locker JK (2001a) Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: thin-section analyses. *J Virol* **75**(22): 11056-11070

Griffiths G, Wepf R, Wendt T, Locker JK, Cyrklaff M, Roos N (2001b) Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: isolated-particle analysis. *J Virol* **75**(22): 11034-11055

Guan KL (1994) The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cell Signal* **6**(6): 581-589

Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Conde R, Pascual-Montano A, Harshman K, Esteban M (2004) Microarray analysis reveals characteristic changes of host cell gene expression in response to

attenuated modified vaccinia virus Ankara infection of human HeLa cells. *J Virol* **78**(11): 5820-5834

Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Pascual-Montano A, Munoz M, Harshman K, Esteban M (2003) Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells. *J Virol* **77**(11): 6493-6506

Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Pascual-Montano A, Najera JL, Zaballos A, Esteban M (2006) Host response to the attenuated poxvirus vector NYVAC: upregulation of apoptotic genes and NF-kappaB-responsive genes in infected HeLa cells. *J Virol* **80**(2): 985-998

Guerra S, Najera JL, Gonzalez JM, Lopez-Fernandez LA, Climent N, Gatell JM, Gallart T, Esteban M (2007) Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. *J Virol* **81**(16): 8707-8721

Hammer M, Echtenachter B, Weighardt H, Jozefowski K, Rose-John S, Mannel DN, Holzmann B, Lang R (2010) Increased inflammation and lethality of Dusp1^{-/-} mice in polymicrobial peritonitis models. *Immunology* **131**(3): 395-404

Hammer M, Mages J, Dietrich H, Servatius A, Howells N, Cato AC, Lang R (2006) Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J Exp Med* **203**(1): 15-20

Hou W, Gibbs JS, Lu X, Brooke CB, Roy D, Modlin RL, Bennink JR, Yewdell JW (2012) Viral infection triggers rapid differentiation of human blood monocytes into dendritic cells. *Blood* **119**(13): 3128-3131

Huang G, Shi LZ, Chi H (2009) Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination. *Cytokine* **48**(3): 161-169

Huang G, Wang Y, Chi H (2012) Regulation of TH17 cell differentiation by innate immune signals. *Cell Mol Immunol* **9**(4): 287-295

Huang G, Wang Y, Shi LZ, Kanneganti TD, Chi H (2011a) Signaling by the phosphatase MKP-1 in dendritic cells imprints distinct effector and regulatory T cell fates. *Immunity* **35**(1): 45-58

Huang WR, Wang YC, Chi PI, Wang L, Wang CY, Lin CH, Liu HJ (2011b) Cell entry of avian reovirus follows a caveolin-1-mediated and dynamin-2-dependent endocytic pathway that requires activation of p38 MAPK and Src signaling pathways as well as microtubules and small GTPase Rab5. *J Biol Chem*

Huang Y, Fan W (2002) IkappaB kinase activation is involved in regulation of paclitaxel-induced apoptosis in human tumor cell lines. *Mol Pharmacol* **61**(1): 105-113

Iborra S, Izquierdo HM, Martinez-Lopez M, Blanco-Menendez N, Reis e Sousa C, Sancho D (2012) The DC receptor DNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice. *J Clin Invest* **122**(5): 1628-1643

Ip YT, Davis RJ (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from

inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**(2): 205-219

Iwasaki A, Medzhitov R (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* **327**(5963): 291-295

Jan RH, Lin YL, Chen CJ, Lin TY, Hsu YC, Chen LK, Chiang BL (2012) Hepatitis B virus surface antigen can activate human monocyte-derived dendritic cells by NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase mediated signaling. *Microbiol Immunol*

Jensen ON, Houthaeve T, Shevchenko A, Cudmore S, Ashford T, Mann M, Griffiths G, Krijnse Locker J (1996) Identification of the major membrane and core proteins of vaccinia virus by two-dimensional electrophoresis. *J Virol* **70**(11): 7485-7497

Jezek Z, Khodakevich LN (1987) Ten years of freedom from smallpox: lessons and experiences. Dedicated to the tenth anniversary of worldwide freedom from smallpox. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* **31**(3): 237-244

Jezek Z, Khodakevich LN, Wickett JF (1987) Smallpox and its post-eradication surveillance. *Bull World Health Organ* **65**(4): 425-434

Johnston JB, McFadden G (2004) Technical knockout: understanding poxvirus pathogenesis by selectively deleting viral immunomodulatory genes. *Cell Microbiol* **6**(8): 695-705

Joklik WK (1962) The purification of four strains of poxvirus. *Virology* **18**: 9-18

Kar S, Ukil A, Sharma G, Das PK (2010)
) MAPK-directed phosphatases preferentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in experimental visceral leishmaniasis: involvement of distinct protein kinase C isoforms. *J Leukoc Biol* **88**(1): 9-20

Karin M (1998) Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. *Ann N Y Acad Sci* **851**: 139-146

Keefer MC, Frey SE, Elizaga M, Metch B, De Rosa SC, Barroso PF, Tomaras G, Cardinali M, Goepfert P, Kalichman A, Philippon V, McElrath MJ, Jin X, Ferrari G, Defawe OD, Mazzara GP, Montefiori D, Pensiero M, Panicali DL, Corey L (2011) A phase I trial of preventive HIV vaccination with heterologous poxviral-vectors containing matching HIV-1 inserts in healthy HIV-uninfected subjects. *Vaccine* **29**(10): 1948-1958

Klotz C, Ziegler T, Figueiredo AS, Rausch S, Hepworth MR, Obsivac N, Sers C, Lang R, Hammerstein P, Lucius R, Hartmann S (2011) A helminth immunomodulator exploits host signaling events to regulate cytokine production in macrophages. *PLoS Pathog* **7**(1): e1001248

Kochan G, Escors D, Gonzalez JM, Casasnovas JM, Esteban M (2008) Membrane cell fusion activity of the vaccinia virus A17-A27 protein complex. *Cell Microbiol* **10**(1): 149-164

Krupa M, Canamero M, Gomez CE, Najera JL, Gil J, Esteban M (2011) Immunization with recombinant DNA and modified vaccinia virus Ankara (MVA) vectors delivering PSCA and STEAP1 antigens inhibits prostate cancer progression. *Vaccine* **29**(7): 1504-1513

Kugler S, Schuller S, Goebel W (1997) Involvement of MAP-kinases and -phosphatases in uptake and intracellular replication of *Listeria monocytogenes* in J774 macrophage cells. *FEMS Microbiol Lett* **157**(1): 131-136

Kuwano Y, Gorospe M (2008) Protecting the stress response, guarding the MKP-1 mRNA. *Cell Cycle* **7**(17): 2640-2642

Langland JO, Kash JC, Carter V, Thomas MJ, Katze MG, Jacobs BL (2006) Suppression of proinflammatory signal transduction and gene expression by the dual nucleic acid binding domains of the vaccinia virus E3L proteins. *J Virol* **80**(20): 10083-10095

Law M, Carter GC, Roberts KL, Hollinshead M, Smith GL (2006) Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(15): 5989-5994

Li B, Yi P, Zhang B, Xu C, Liu Q, Pi Z, Xu X, Chevet E, Liu J (2011) Differences in endoplasmic reticulum stress signalling kinetics determine cell survival outcome through activation of MKP-1. *Cell Signal* **23**(1): 35-45

Li J, Gorospe M, Hutter D, Barnes J, Keyse SM, Liu Y (2001) Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation. *Mol Cell Biol* **21**(23): 8213-8224

Li M, Zhou JY, Ge Y, Matherly LH, Wu GS (2003) The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. *J Biol Chem* **278**(42): 41059-41068

Li Y, Yuan S, Moyer RW (1998) The non-permissive infection of insect (gypsy moth) LD-652 cells by Vaccinia virus. *Virology* **248**(1): 74-82

Liao Y, Wang X, Huang M, Tam JP, Liu DX (2011) Regulation of the p38 mitogen-activated protein kinase and dual-specificity phosphatase 1 feedback loop modulates the induction of interleukin 6 and 8 in cells infected with coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* **420**(2): 106-116

Lin S, Chen W, Broyles SS (1992) The vaccinia virus B1R gene product is a serine/threonine protein kinase. *J Virol* **66**(5): 2717-2723

Lin YW, Yang JL (2006) Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling. *J Biol Chem* **281**(2): 915-926

Liu J, Lin A (2005) Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res* **15**(1): 36-42

Liu L, Zhong Q, Tian T, Dubin K, Athale SK, Kupper TS (2010) Epidermal injury and infection during poxvirus immunization is crucial for the generation of highly protective T cell-mediated immunity. *Nat Med* **16**(2): 224-227

Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD (2007) MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat Rev Immunol* **7**(3): 202-212

Ludwig H, Mages J, Staib C, Lehmann MH, Lang R, Sutter G (2005) Role of viral factor E3L in

modified vaccinia virus ankara infection of human HeLa Cells: regulation of the virus life cycle and identification of differentially expressed host genes. *J Virol* **79**(4): 2584-2596

Mandl M, Slack DN, Keyse SM (2005) Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. *Mol Cell Biol* **25**(5): 1830-1845

Manetsch M, Che W, Seidel P, Chen Y, Ammit AJ (2012) MKP-1: a negative feedback effector that represses MAPK-mediated pro-inflammatory signaling pathways and cytokine secretion in human airway smooth muscle cells. *Cell Signal* **24**(4): 907-913

Mann BA, Huang JH, Li P, Chang HC, Slee RB, O'Sullivan A, Anita M, Yeh N, Klemsz MJ, Brutkiewicz RR, Blum JS, Kaplan MH (2008) Vaccinia virus blocks Stat1-dependent and Stat1-independent gene expression induced by type I and type II interferons. *J Interferon Cytokine Res* **28**(6): 367-380

Marshall CJ (1994) MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* **4**(1): 82-89

Marshall CJ (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**(2): 179-185

McFadden G (2005) Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* **3**(3): 201-213

Medders KE, Sejbuk NE, Maung R, Desai MK, Kaul M (2010) Activation of p38 MAPK is required in monocytic and neuronal cells for HIV glycoprotein 120-induced neurotoxicity. *J Immunol* **185**(8): 4883-4895

Mercer J, Traktman P (2003) Investigation of structural and functional motifs within the vaccinia virus A14 phosphoprotein, an essential component of the virion membrane. *J Virol* **77**(16): 8857-8871

Merchlinsky M, Moss B (1989) Resolution of vaccinia virus DNA concatemer junctions requires late-gene expression. *J Virol* **63**(4): 1595-1603

Meyer H, Sutter G, Mayr A (1991) Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol* **72** (Pt 5): 1031-1038

Moncho-Amor V, Ibanez de Caceres I, Bandres E, Martinez-Poveda B, Orgaz JL, Sanchez-Perez I, Zazo S, Rovira A, Albanell J, Jimenez B, Rojo F, Belda-Iniesta C, Garcia-Foncillas J, Perona R (2011) DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* **30**(6): 668-678

Mooij P, Balla-Jhagjhoorsingh SS, Koopman G, Beenhakker N, van Haaften P, Baak I, Nieuwenhuis IG, Kondova I, Wagner R, Wolf H, Gomez CE, Najera JL, Jimenez V, Esteban M, Heeney JL (2008) Differential CD4⁺ versus CD8⁺ T-cell responses elicited by different poxvirus-based human immunodeficiency virus type 1 vaccine candidates provide comparable efficacies in primates. *J Virol* **82**(6): 2975-2988

Morgan C, Ellison SA, Rose HM, Moore DH (1955) Serial sections of vaccinia virus examined

at one stage of development in the electron microscope. *Exp Cell Res* **9**(3): 572-578

Morgan GW, Hollinshead M, Ferguson BJ, Murphy BJ, Carpentier DC, Smith GL (2010) Vaccinia protein F12 has structural similarity to kinesin light chain and contains a motor binding motif required for virion export. *PLoS Pathog* **6**(2): e1000785

Moss B (1996) Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11341-11348

Moss B (2001) Poxviridae: the viruses and their replication. *Fields Fundamental Virology*: 1249-1283

Moss B (2012

) Poxvirus cell entry: how many proteins does it take? *Viruses* **4**(5): 688-707

Moss B, Carroll MW, Wyatt LS, Bennink JR, Hirsch VM, Goldstein S, Elkins WR, Fuerst TR, Lifson JD, Piatak M, Restifo NP, Overwijk W, Chamberlain R, Rosenberg SA, Sutter G (1996) Host range restricted, non-replicating vaccinia virus vectors as vaccine candidates. *Adv Exp Med Biol* **397**: 7-13

Murphy LO, Blenis J (2006) MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* **31**(5): 268-275

Najera JL, Gomez CE, Domingo-Gil E, Gherardi MM, Esteban M (2006) Cellular and biochemical differences between two attenuated poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene. *J Virol* **80**(12): 6033-6047

Nithianandarajah-Jones GN, Wilm B, Goldring CE, Muller J, Cross MJ (2012) ERK5: structure, regulation and function. *Cell Signal* **24**(11): 2187-2196

Obst R, van Santen HM, Mathis D, Benoist C (2005) Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4(+) T cell response. *J Exp Med* **201**(10): 1555-1565

Owens DM, Keyse SM (2007) Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**(22): 3203-3213

Paoletti E (1996) Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11349-11353

Paulnock DM (1992) Macrophage activation by T cells. *Curr Opin Immunol* **4**(3): 344-349

Payne L (1978) Polypeptide composition of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Virol* **27**(1): 28-37

Payne LG, Kristensson K (1985) Extracellular release of enveloped vaccinia virus from mouse nasal epithelial cells in vivo. *J Gen Virol* **66** (Pt 3): 643-646

Perdiguero B, Esteban M (2009) The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J Interferon Cytokine Res* **29**(9): 581-598

- Perdiguero E, Kharraz Y, Serrano AL, Munoz-Canoves P (2012) MKP-1 coordinates ordered macrophage-phenotype transitions essential for stem cell-dependent tissue repair. *Cell Cycle* **11**(5): 877-886
- Pereira AC, Soares-Martins JA, Leite FG, Da Cruz AF, Torres AA, Souto-Padron T, Kroon EG, Ferreira PC, Bonjardim CA (2012) SP600125 inhibits Orthopoxviruses replication in a JNK1/2 - independent manner: Implication as a potential antipoxviral. *Antiviral Res* **93**(1): 69-77
- Perez-Jimenez E, Kochan G, Gherardi MM, Esteban M (2006) MVA-LACK as a safe and efficient vector for vaccination against leishmaniasis. *Microbes Infect* **8**(3): 810-822
- Pincus S, Tartaglia J, Paoletti E (1995) Poxvirus-based vectors as vaccine candidates. *Biologicals* **23**(2): 159-164
- Pulendran B, Ahmed R (2006) Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* **124**(4): 849-863
- Punjabi A, Traktman P (2005) Cell biological and functional characterization of the vaccinia virus F10 kinase: implications for the mechanism of virion morphogenesis. *J Virol* **79**(4): 2171-2190
- Qin Z, Dai L, Defee M, Findlay VJ, Watson DK, Toole BP, Cameron J, Peruzzi F, Kirkwood K, Parsons C (2013) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus suppression of DUSP1 facilitates cellular pathogenesis following de novo infection. *J Virol* **87**(1): 621-635
- Ramirez JC, Finke D, Esteban M, Kraehenbuhl JP, Acha-Orbea H (2003) Tissue distribution of the Ankara strain of vaccinia virus (MVA) after mucosal or systemic administration. *Arch Virol* **148**(5): 827-839
- Rauch J, Volinsky N, Romano D, Kolch W (2011) The secret life of kinases: functions beyond catalysis. *Cell Commun Signal* **9**(1): 23
- Renukaradhya GJ, Khan MA, Shaji D, Brutkiewicz RR (2008) Vesicular stomatitis virus matrix protein impairs CD1d-mediated antigen presentation through activation of the p38 MAPK pathway. *J Virol* **82**(24): 12535-12542
- Resch W, Weisberg AS, Moss B (2005) Vaccinia virus nonstructural protein encoded by the A11R gene is required for formation of the virion membrane. *J Virol* **79**(11): 6598-6609
- Rincon M, Pedraza-Alva G (2003) JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev* **192**: 131-142
- Rodriguez N, Dietrich H, Mossbrugger I, Weintz G, Scheller J, Hammer M, Quintanilla-Martinez L, Rose-John S, Miethke T, Lang R (2010) Increased inflammation and impaired resistance to *Chlamydomydia pneumoniae* infection in Dusp1(-/-) mice: critical role of IL-6. *J Leukoc Biol* **88**(3): 579-587
- Rosini P, De Chiara G, Bonini P, Lucibello M, Marcocci ME, Garaci E, Cozzolino F, Torcia M (2004) Nerve growth factor-dependent survival of CESS B cell line is mediated by increased expression and decreased degradation of MAPK phosphatase 1. *J Biol Chem* **279**(14): 14016-

- Sakaue H, Ogawa W, Nakamura T, Mori T, Nakamura K, Kasuga M (2004) Role of MAPK phosphatase-1 (MKP-1) in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **279**(38): 39951-39957
- Salojin K, Oravec T (2007) Regulation of innate immunity by MAPK dual-specificity phosphatases: knockout models reveal new tricks of old genes. *J Leukoc Biol* **81**(4): 860-869
- Salojin KV, Owusu IB, Millerchip KA, Potter M, Platt KA, Oravec T (2006) Essential role of MAPK phosphatase-1 in the negative control of innate immune responses. *J Immunol* **176**(3): 1899-1907
- Sanchez-Sampedro L, Gomez CE, Mejias-Perez E, Sorzano CO, Esteban M (2012) High quality long-term CD4+ and CD8+ effector memory populations stimulated by DNA-LACK/MVA-LACK regimen in Leishmania major BALB/c model of infection. *PLoS One* **7**(6): e38859
- Sanchez-Tillo E, Comalada M, Xaus J, Farrera C, Valledor AF, Caelles C, Lloberas J, Celada A (2007) JNK1 Is required for the induction of Mkp1 expression in macrophages during proliferation and lipopolysaccharide-dependent activation. *J Biol Chem* **282**(17): 12566-12573
- Sancho MC, Schleich S, Griffiths G, Krijnse-Locker J (2002) The block in assembly of modified vaccinia virus Ankara in HeLa cells reveals new insights into vaccinia virus morphogenesis. *J Virol* **76**(16): 8318-8334
- Sanderson CM, Frischknecht F, Way M, Hollinshead M, Smith GL (1998) Roles of vaccinia virus EEV-specific proteins in intracellular actin tail formation and low pH-induced cell-cell fusion. *J Gen Virol* **79** (Pt 6): 1415-1425
- Sanderson CM, Hollinshead M, Smith GL (2000) The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. *J Gen Virol* **81**(Pt 1): 47-58
- Santos CR, Blanco S, Sevilla A, Lazo PA (2006) Vaccinia virus B1R kinase interacts with JIP1 and modulates c-Jun-dependent signaling. *J Virol* **80**(15): 7667-7675
- Schmidt FI, Bleck CK, Helenius A, Mercer J (2011) Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture. *EMBO J* **30**(17): 3647-3661
- Schmidt FI, Bleck CK, Mercer J (2012) Poxvirus host cell entry. *Curr Opin Virol* **2**(1): 20-27
- Schwan WR, Kugler S, Schuller S, Kopecko DJ, Goebel W (1996) Detection and characterization by differential PCR of host eukaryotic cell genes differentially transcribed following uptake of intracellular bacteria. *Infect Immun* **64**(1): 91-99
- Schweneker M, Lukassen S, Spath M, Wolferstatter M, Babel E, Brinkmann K, Wielert U, Chaplin P, Suter M, Hausmann J (2012) The vaccinia virus O1 protein is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and promotes viral virulence. *J Virol* **86**(4): 2323-2336
- Seet BT, Johnston JB, Brunetti CR, Barrett JW, Everett H, Cameron C, Sypula J, Nazarian SH,

Lucas A, McFadden G (2003) Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* **21**: 377-423

Senkevich TG, Ojeda S, Townsley A, Nelson GE, Moss B (2005) Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51): 18572-18577

Slack DN, Seternes OM, Gabrielsen M, Keyse SM (2001) Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *J Biol Chem* **276**(19): 16491-16500

Smith GL, Symons JA, Khanna A, Vanderplasschen A, Alcamí A (1997) Vaccinia virus immune evasion. *Immunol Rev* **159**: 137-154

Soares JA, Leite FG, Andrade LG, Torres AA, De Sousa LP, Barcelos LS, Teixeira MM, Ferreira PC, Kroon EG, Souto-Padron T, Bonjardim CA (2009) Activation of the PI3K/Akt pathway early during vaccinia and cowpox virus infections is required for both host survival and viral replication. *J Virol* **83**(13): 6883-6899

Soloski MJ, Holowczak JA (1981) Characterization of supercoiled nucleoprotein complexes released from detergent-treated vaccinia virions. *J Virol* **37**(2): 770-783

Srivastava N, Sudan R, Saha B (2011) CD40-modulated dual-specificity phosphatases MAPK phosphatase (MKP)-1 and MKP-3 reciprocally regulate Leishmania major infection. *J Immunol* **186**(10): 5863-5872

Stanford MM, McFadden G, Karupiah G, Chaudhri G (2007) Immunopathogenesis of poxvirus infections: forecasting the impending storm. *Immunol Cell Biol* **85**(2): 93-102

Sutter G, Ramsey-Ewing A, Rosales R, Moss B (1994) Stable expression of the vaccinia virus K1L gene in rabbit cells complements the host range defect of a vaccinia virus mutant. *J Virol* **68**(7): 4109-4116

Sutter G, Staib C (2003) Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr Drug Targets Infect Disord* **3**(3): 263-271

Sypula J, Wang F., Ma, Y., Bell J. & McFadden G. (2004) Myxoma virus tropism in human tumor cells. *Gene Ther Mol Biol* **8**: 103-114

Takamura S, Roberts AD, Jelley-Gibbs DM, Wittmer ST, Kohlmeier JE, Woodland DL (2010) The route of priming influences the ability of respiratory virus-specific memory CD8⁺ T cells to be activated by residual antigen. *J Exp Med* **207**(6): 1153-1160

Takeuchi K, Shin-ya T, Nishio K, Ito F (2009) Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 modulated JNK activation is critical for apoptosis induced by inhibitor of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase. *FEBS J* **276**(5): 1255-1265

Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, Norton EK, Audonnet JC, Cox WI, Davis SW, van der Hoeven J, Meignier B, Riviere M, et al. (1992) NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* **188**(1): 217-232

Taylor JM, Quilty D, Banadyga L, Barry M (2006) The vaccinia virus protein F1L interacts with

Bim and inhibits activation of the pro-apoptotic protein Bax. *J Biol Chem* **281**(51): 39728-39739

Tolonen N, Doglio L, Schleich S, Krijnse Locker J (2001) Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol Biol Cell* **12**(7): 2031-2046

Townsley AC, Senkevich TG, Moss B (2005) Vaccinia virus A21 virion membrane protein is required for cell entry and fusion. *J Virol* **79**(15): 9458-9469

Townsley AC, Weisberg AS, Wagenaar TR, Moss B (2006) Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *J Virol* **80**(18): 8899-8908

Traktman P (1991) Molecular and biochemical analysis of poxvirus DNA replication. *Semin Virol* **2**: 291-304

Unger B, Mercer J, Boyle KA, Traktman P (2012) Biogenesis of the Vaccinia Virus Membrane: Genetic and Ultrastructural Analysis of the Contributions of the A14 and A17 Proteins. *J Virol*

Vattakuzhi Y, Abraham SM, Freidin A, Clark AR, Horwood NJ (2012) Dual-specificity phosphatase 1-null mice exhibit spontaneous osteolytic disease and enhanced inflammatory osteolysis in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* **64**(7): 2201-2210

Verheust C, Goossens M, Pauwels K, Breyer D (2012) Biosafety aspects of modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors used for gene therapy or vaccination. *Vaccine* **30**(16): 2623-2632

W.H.O (1980) The global eradication of smallpox. Final report of the global commission for the certification of smallpox eradication, Geneva. *World Health Organization*

Wancket LM, Frazier WJ, Liu Y (2011) Mitogen-activated protein kinase phosphatase (MKP)-1 in immunology, physiology, and disease. *Life Sci* **90**(7-8): 237-248

Wang S, Shuman S (1995) Vaccinia virus morphogenesis is blocked by temperature-sensitive mutations in the F10 gene, which encodes protein kinase 2. *J Virol* **69**(10): 6376-6388

Wang X, Liu Y (2007) Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1. *Cell Signal* **19**(7): 1372-1382

Wang Z, Cao N, Nantajit D, Fan M, Liu Y, Li JJ (2008) Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 represses c-Jun NH2-terminal kinase-mediated apoptosis via NF-kappaB regulation. *J Biol Chem* **283**(30): 21011-21023

Werden SJ, Rahman MM, McFadden G (2008) Poxvirus host range genes. *Adv Virus Res* **71**: 135-171

Wu JJ, Roth RJ, Anderson EJ, Hong EG, Lee MK, Choi CS, Neuffer PD, Shulman GI, Kim JK, Bennett AM (2006) Mice lacking MAP kinase phosphatase-1 have enhanced MAP kinase activity and resistance to diet-induced obesity. *Cell Metab* **4**(1): 61-73

Wu JJ, Zhang L, Bennett AM (2005) The noncatalytic amino terminus of mitogen-activated

protein kinase phosphatase 1 directs nuclear targeting and serum response element transcriptional regulation. *Mol Cell Biol* **25**(11): 4792-4803

Xing Z, Cardona CJ, Anunciacion J, Adams S, Dao N (2009) Roles of the ERK MAPK in the regulation of proinflammatory and apoptotic responses in chicken macrophages infected with H9N2 avian influenza virus. *J Gen Virol* **91**(Pt 2): 343-351

Yan M, Templeton DJ (1994) Identification of 2 serine residues of MEK-1 that are differentially phosphorylated during activation by raf and MEK kinase. *J Biol Chem* **269**(29): 19067-19073

Yoon S, Seger R (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**(1): 21-44

Zhang Y, Reynolds JM, Chang SH, Martin-Orozco N, Chung Y, Nurieva RI, Dong C (2009) MKP-1 is necessary for T cell activation and function. *J Biol Chem* **284**(45): 30815-30824

Zhao Q, Shepherd EG, Manson ME, Nelin LD, Sorokin A, Liu Y (2005) The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *J Biol Chem* **280**(9): 8101-8108

IX. ANEXO

Vaccinia Virus E3 Protein Prevents the Antiviral Action of ISG15

Susana Guerra^{1,2*}, Ana Cáceres¹, Klaus-Peter Knobeloch³, Ivan Horak³, Mariano Esteban^{1*}

1 Department of Molecular and Cellular Biology, Centro Nacional de Biotecnología CSIC, Campus Universidad Autónoma, Madrid, Spain, **2** Department of Preventive Medicine and Public Health, Universidad Autónoma, Madrid, Spain, **3** Abteilung Molekulare Genetik, Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie, Berlin, Germany

Abstract

The ubiquitin-like modifier ISG15 is one of the most predominant proteins induced by type I interferons (IFN). In this study, murine embryo fibroblast (MEFs) and mice lacking the gene were used to demonstrate a novel role of ISG15 as a host defense molecule against vaccinia virus (VACV) infection. In MEFs, the growth of replication competent Western Reserve (WR) VACV strain was affected by the absence of ISG15, but in addition, virus lacking E3 protein (V Δ E3L) that is unable to grow in ISG15+/+ cells replicated in ISG15-deficient cells. Inhibiting ISG15 with siRNA or promoting its expression in ISG15–/– cells with a lentivirus vector showed that VACV replication was controlled by ISG15. Immunoprecipitation analysis revealed that E3 binds ISG15 through its C-terminal domain. The VACV antiviral action of ISG15 and its interaction with E3 are events independent of PKR (double-stranded RNA-dependent protein kinase). In mice lacking ISG15, infection with V Δ E3L caused significant disease and mortality, an effect not observed in V Δ E3L-infected ISG15+/+ mice. Pathogenesis in ISG15-deficient mice infected with V Δ E3L or with an E3L deletion mutant virus lacking the C-terminal domain triggered an enhanced inflammatory response in the lungs compared with ISG15+/+ infected mice. These findings showed an anti-VACV function of ISG15, with the virus E3 protein suppressing the action of the ISG15 antiviral factor.

Citation: Guerra S, Cáceres A, Knobeloch K-P, Horak I, Esteban M (2008) Vaccinia Virus E3 Protein Prevents the Antiviral Action of ISG15. PLoS Pathog 4(7): e1000096. doi:10.1371/journal.ppat.1000096

Editor: Mark L. Buller, Saint Louis University, United States of America

Received: January 29, 2008; **Accepted:** May 29, 2008; **Published:** July 4, 2008

Copyright: © 2008 Guerra et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The work was supported by the Ramón y Cajal program from Ministry of Education and Science of Spain and grants from the European Union, QLK2-CT-2002-01867 (Vaccinia Vectors), LSHP-CT-2006-037536 (MVACTOR), and Fundación Botín.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: sguerra@cnb.csic.es (SG); mesteban@cnb.csic.es (ME)

Introduction

Type I interferons (IFN- α and - β) serve a critical role in antiviral innate immunity and in modulating the adaptive immune response to infection and tumor development [1]. In response to infection or Toll-like receptor agonists, IFN is produced and consequently leads to the up-regulation of hundreds of IFN-stimulated genes (ISG) [2,3]. One of the most highly induced genes is ISG15 that encodes a small UBL protein of 17 kDa that forms covalent conjugates with cellular proteins [4]. ISG15 is composed of two domains, each of which carries high sequence and structural similarity to UB (33 and 32% for the N- and C-terminal domains, respectively) [5,6].

ISG15 conjugation (ISGylation) to substrate proteins occurs in a manner similar to UB conjugation by utilizing activating, conjugating and ligating enzymes to facilitate the addition of ISG15 to specific lysine residues [7]. The ISG15 activating enzyme is ubiquitin E1 like protein (UBE1L), and the E2 enzyme for UB conjugation, UbcH8, also recognizes ISG15 [8,9,10]. ISG15 is removed from conjugated proteins by an ISG15-specific protease, UBP43 (USP18 (UB-specific protease 18)) [11,12,13]. UB as a central cellular regulator and UB-mediated proteolysis also plays a regulatory role in the immune system [14,15]. While the degradation by the proteasome generally depends on poly-UB conjugation, protein modification by ISG15 does not typically cause substrate degradation [16]. Instead it may alter the subcellular localization, structure, stability or activity of targeted proteins [17]. A large number of cellular proteins that are associated with cellular cytoskeleton, stress response and chroma-

tin remodelling were identified as ISG15 targets. ISG15 also targets proteins that play a role in the innate antiviral response, including: PKR, MXA, STAT1, JAK1 and RIG-I [18]. ISGylation of these antiviral molecules may regulate their activity during viral infection.

ISG15 expression is almost undetectable under normal conditions but is strongly up-regulated during viral infections such as human cytomegalovirus (HCMV), herpes simplex virus (HSV), Sindbis virus (SV) and hepatitis C virus (HCV) [19,20,21,22,23,24]. It has been speculated that the ISG15 up-regulation following viral infection is involved in different strategies of the antiviral response [25,26]. Some viruses have developed specific strategies to counteract the activity of the IFN-stimulated genes (ISGs). The influenza B virus protein NS1B binds ISG15 and blocks protein ISGylation [27]. Furthermore, constitutive expression of ISG15 in type I IFN receptor knockout (KO) mice confers potent antiviral activity against SV. This evidence suggests that ISGylation is important for protecting cells from viral infection [21].

Previously, using cDNA microarrays we described up-regulation of ISG15 after infection of HeLa cells with the attenuated VACV strains MVA and NYVAC, an effect not observed after infection with the virulent strain WR [28,29,30]. Furthermore, the attenuated mutant V Δ E3L that lacks the viral early protein E3 also produces an increase in the ISG15 mRNA levels [31]. V Δ E3L is a virus that only replicates in IFN-incompetent systems exerting IFN antagonist activity [32], is nonpathogenic in the mouse model, and provides protection against a wild-type virus challenge [33,34]. The E3 protein represses the host cell antiviral response by multiple

Author Summary

Modification of proteins by ubiquitin (UB) and ubiquitin-like proteins (UBL) represents a key regulatory process of innate and adaptive immune responses. Interferon-stimulated gene product 15 (ISG15) is a member of UBL molecules that can reversibly be conjugated to proteins mediating considerable antiviral response. In turn, many viruses, including poxviruses, have evolved strategies to block the antiviral and inflammatory effects of innate immune responses to keep cells alive until virus replication is completed. Here, a novel viral immune evasion mechanism that inhibits ISG15-dependent antiviral pathway is described. Vaccinia virus (VACV) pathogenesis in ISG15^{+/+} versus ISG15^{-/-} mice is linked to the virus E3 protein, blocking the activity of ISG15 through its C-terminal domain. This effect was independent of PKR activation. ISG15 controls the inflammatory response regulating cytokine levels. Our findings support a new strategy for poxviruses to evade the host antiviral response through interaction of the virus E3 protein with ISG15.

mechanisms, including inhibition of both PKR and RNase L, two enzymes induced by IFN and whose activation triggers a global inhibition of protein synthesis and virus replication [35,36,37] through the phosphorylation of eIF-2 α (for PKR) and breakdown of RNA (for RNase L). Significantly, once activated both PKR and RNase L produced upregulation of ISG15 messenger levels [38,39]. E3 also blocks induction of IFN- α/β through inhibition of phosphorylation of the transcription factors IRF3 and IRF7 [40,41] and prevention of NF- κ B activation [42].

The biological significance of ISG15 mRNA induction in cultured cells after infection with the VACV mutants and its repression by the virulent WR is not known. Here we have investigated the role of ISG15 as an anti-VACV immunity factor using *in vitro* and *in vivo* systems based on MEFs and mice lacking ISG15. While in MEFs the yields of WR were slightly different between ISG15^{+/+} and ISG15^{-/-} infected cells, the non-replicating VV Δ E3L in ISG15^{+/+} cells grew more than one log better in ISG15^{-/-} cells. Biochemical analyses showed that the E3 protein interacts with ISG15 through its carboxyl terminal domain. Repression of ISG15 with siRNAs or expression of ISG15 by a lentivirus vector in ISG15 null cells indicate that VACV replication can be controlled by ISG15 and that E3/ISG15 protein interaction is independent of the presence of PKR. In mice lacking ISG15, VV Δ E3L induced stronger pathogenesis than in ISG15^{+/+}, an effect similarly triggered by a C-terminal deletion mutant (VVE3L Δ 26C). Our findings reveal a novel VACV strategy to counteract the IFN antiviral response through interaction of the virus E3 protein with ISG15.

Results

Expression of ISG15 is upregulated during infection of human HeLa and murine embryonic fibroblast cells with attenuated VACV strains

We and others have previously described upregulation of ISG15 transcript from gene expression profiles of HeLa cells infected with the attenuated VACV strains, VV Δ E3L [31], MVA [28] and NYVAC [30]. This up-regulation was not observed in HeLa cells infected with the virulent WR [29]. Here, we have validated the transcriptional changes in ISG15 mRNA levels after VACV infection by real-time RT-PCR. As shown in Table S1, ISG15 mRNA levels at different times postinfection (p.i.) were enhanced

in HeLa cells infected with the mutant viruses compared to the virulent WR, in agreement with the microarray data (not shown).

To correlate changes in ISG15 protein levels, we analyzed by immunoblot the levels of ISG15 in WR- or MVA- or NYVAC- or VV Δ E3L or uninfected MEFs. In agreement with the results of real time RT-PCR obtained in HeLa cells, a clear increase in ISG15 protein levels was also observed in VV Δ E3L- or MVA-infected MEFs cells at 6 and 16 hpi (Fig. 1A). The increase was less apparent after NYVAC infection probably because overall protein synthesis is more severely inhibited by NYVAC than MVA [30]. Moreover, the increase of ISG15 protein levels after VV Δ E3L or MVA infection required *de novo* protein synthesis as its accumulation was prevented by cycloheximide treatment discarding the possibility that infection might increase ISG15 protein levels by enhancing protein stability (not shown). It should be noted that there is an increase in the conjugation of ISG15 to its target proteins after VV Δ E3L, but reduced in levels after MVA infection (Fig. 1A). The findings of Fig. 1 establish a clear up-regulation of ISG15 by the attenuated VACV mutants.

ISG15 has an anti-VACV role and modulates VV Δ E3L replication in cultured cells

Since the increase in ISG15 in HeLa cells correlated with the attenuated phenotype of several VACV strains, we next examined the role of ISG15 in VACV replication using primary MEFs derived from ISG15^{+/+} and ISG15^{-/-} mice. While the cytopathic effect (CPE) observed in ISG15^{-/-} after WR infection (0.1 PFU/cell, 24 h) was similar to ISG15^{+/+} cells (Fig. 2A, upper panels), the CPE in ISG15^{-/-} cells after VV Δ E3L infection was markedly increased with respect to that observed in ISG15^{+/+} cells (Fig. 2A, lower panels). The virus titers for WR were slightly increased in ISG15^{-/-} compared to ISG15^{+/+} cells (Fig. 2B), while the yields of VV Δ E3L were increased in the ISG15^{-/-} compared to ISG15^{+/+} cells (about 25-fold higher). The increase in virus titers correlated with increase in cellular mortality, as shown in Fig. 2A. The findings of Fig. 2 suggest that E3 expression might be suppressing ISG15 function. To define the breadth of the E3 anti-ISG15 activity we analyzed the role of another antiviral factor, PKR, using MEFs derived from PKR^{-/-} mice. Both the difference in CPE and virus yields between VV Δ E3L infected ISG15^{-/-} and PKR^{-/-} cells were clearly distinct (Fig. 1A), indicating that the *in vitro* replication of VV Δ E3L in ISG15^{-/-} is a process independent of PKR. With PKR^{+/+} cells the CPE and virus yields were similar as for ISG15^{+/+} cells (not shown).

To provide further evidence for a VACV antiviral role of ISG15, we used siRNA to specifically block ISG15 mRNA production. Using siPORT Amine as a transfection reagent, MEFs were transfected with two specific ISG15 siRNAs (siRNA1 or siRNA2), or with a specific GAPDH siRNA (positive control) or with a scrambled siRNA (negative control). Twenty four hours after transfection cells were infected with WR or VV Δ E3L (0.1 PFU/cell), and ISG15 expression, CPE and virus titers were evaluated during the course of infection. As shown in Fig. 3A, the two ISG15 siRNAs decreased the expression of ISG15 by over 80% after 24 h of transfection (Fig. 3A). The decrease in ISG15 protein levels was accompanied by an enhanced CPE in VV Δ E3L infected ISG15^{+/+} cells (Fig. 3B); the difference in CPE was less clear in WR-infected cells. In addition, viral titers were enhanced in silenced ISG15^{+/+} cells infected with WR or VV Δ E3L (Fig. 3C). We also performed ISG15 mRNA inhibition with ISG15 siRNAs in PKR^{-/-} cells and found no changes in CPE and virus yields for WR and VV Δ E3L infected cells in comparison to the results obtained in PKR^{+/+} cells (not shown), indicating that the function of E3 protein is independent of PKR activity.

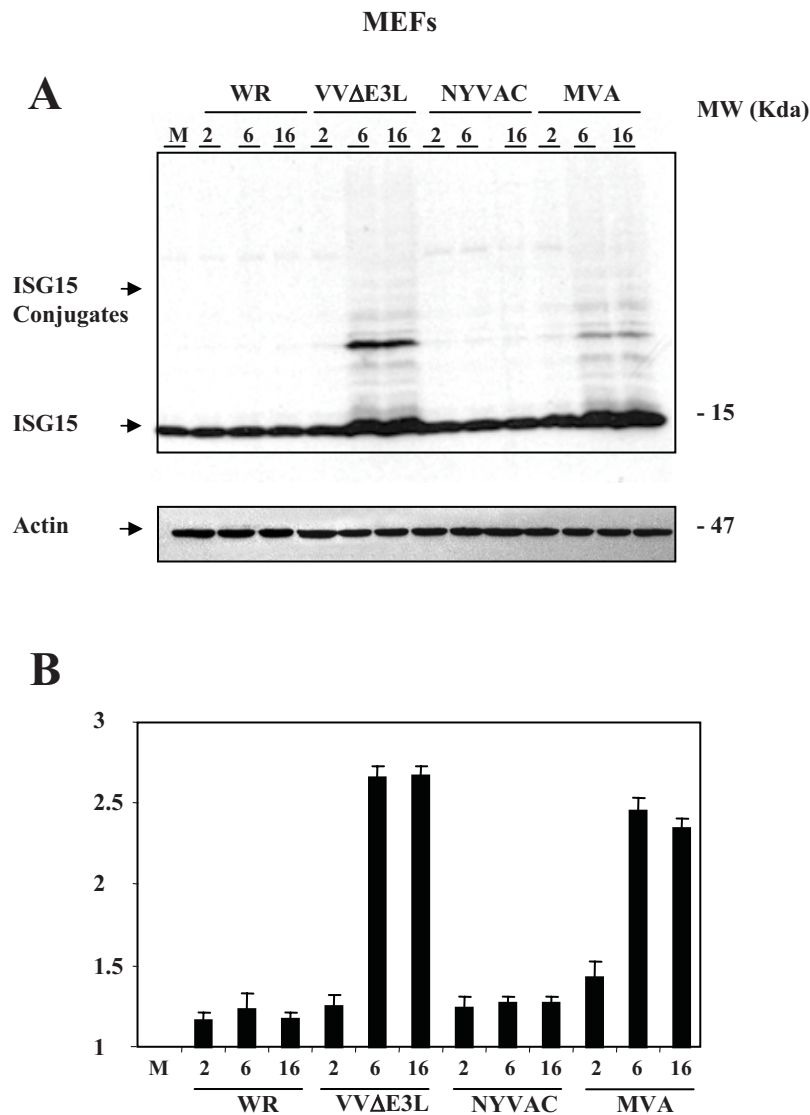


Figure 1. ISG15 protein levels are upregulated during infection of MEFs with the attenuated mutants of vaccinia virus. **A.** ISG15 protein levels after WR or VVΔE3L or MVA or NYVAC infection. MEFs were mock infected (M) or infected at 5 PFU/cell with WR or MVA or NYVAC or VVΔE3L and at the indicated times p.i., cell extracts were analyzed by Western blotting. Equal amounts of proteins were fractionated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose paper, and reacted with an antibody that recognizes murine ISG15 protein. On the right, the molecular weight of the proteins in kilodaltons is indicated. Actin levels showed that the same amount of protein was loaded on the gel. Uninfected cells (M) served as control. **B.** Densitometric quantification of ISG15 protein in arbitrary units is indicated. The graphic represents these measurements in three independent experiments.

doi:10.1371/journal.ppat.1000096.g001

Transfection of GAPDH siRNA or a scrambled siRNA followed by infection with WR or VVΔE3L had no significant effect in either ISG15 protein level, CPE or virus production, indicating the specificity of ISG15 function. We checked that GAPDH protein levels were decreased only in the siRNA-GAPDH transfected cells, as measured by Western blot analysis (not shown). The results of Fig. 3 revealed that suppression of ISG15 protein levels leads to enhanced replication of WR and of VVΔE3L, further supporting an anti VACV role of ISG15.

Absence of ISG15 expression is required for efficient VVΔE3L infection in murine cultured cells

To further extend the role of ISG15 expression in VACV replication, we tested whether ectopic ISG15 expression in

ISG15^{-/-} cells leads to inhibition of WR or VVΔE3L viral growth. Using pRVISG15-ires-GFP, an optimized retroviral vector that expresses efficiently ISG15 in transduced cells, we evaluated the CPE (see Fig. S1) and viral growth of WR or VVΔE3L. Viral titrations showed that retroviral transduction of the *ISG15* gene in ISG15^{-/-} cells result in inefficient VVΔE3L viral production, whereas non-transduced ISG15^{-/-} cells infected with VVΔE3L were able to produce infectious viral particles (Fig. 4C, left panel). Furthermore, yields of VACV infectious virus decreased in the ISG15-transduced cells in comparison to those that do not express ISG15 (Fig. 4C, right panel). These findings demonstrate that the absence of ISG15 is essential for the productive infection of VVΔE3L and the increase in VACV production in murine cultured cells.

To characterize the effect of ISG15 over-expression in WR or VVΔE3L replication in cells with endogenous ISG15, a similar

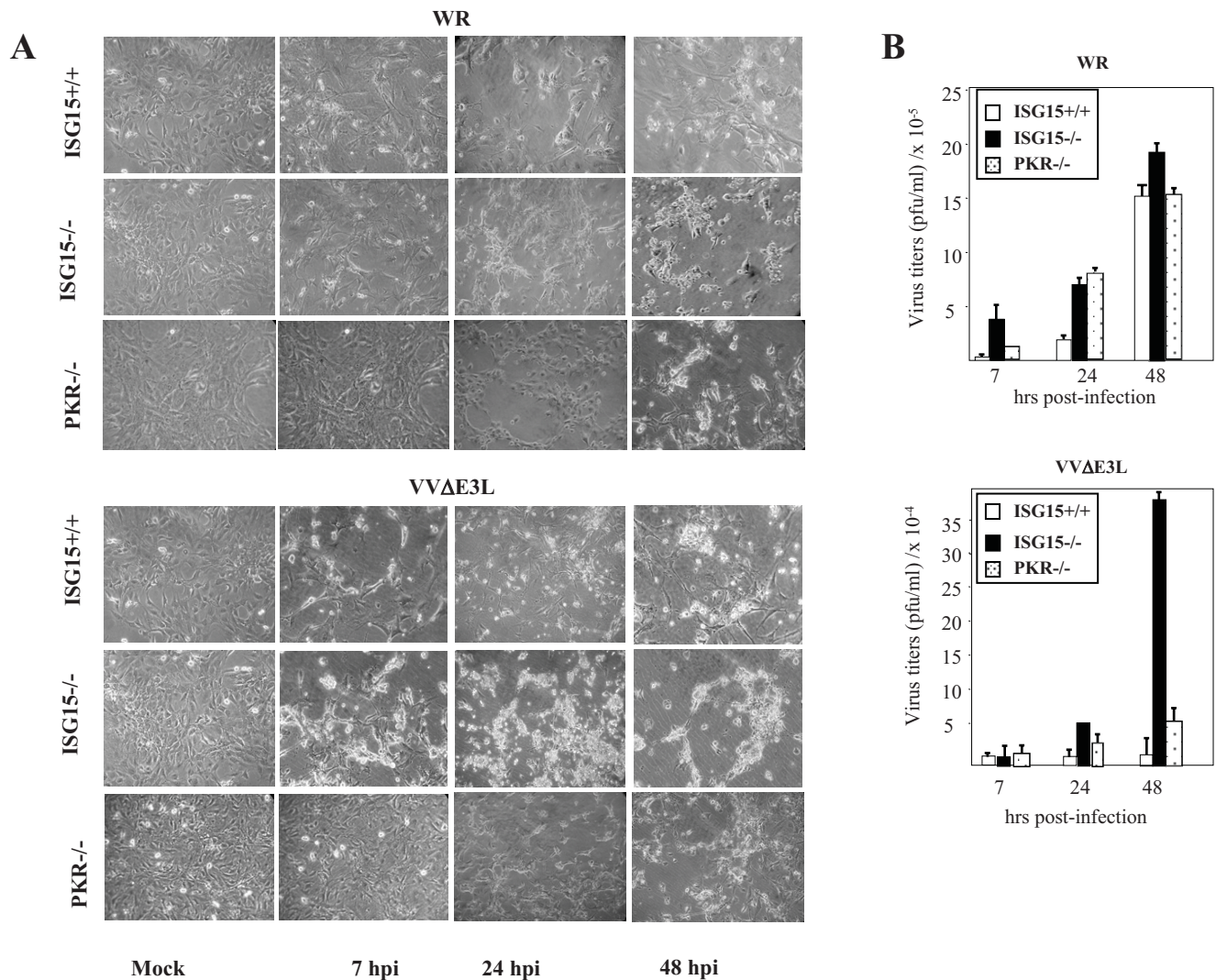


Figure 2. Effect of ISG15 on cytotoxicity and virus growth after infection of MEFs with virulent and E3L deletion VACV mutant viruses. **A.** ISG15^{-/-}, PKR^{-/-} or wild type cells were mock-infected or infected at 0.1 PFU/cell with WR or VVΔE3L. At different times p.i, the CPE in the cells was examined by phase-contrast microscopy. **B.** Virus growth of WR and VVΔE3L infected (0.1 PFU/cell) ISG15^{+/+}, or ISG15^{-/-}, or PKR^{-/-} cells. At different times cells were harvested and virus yields were determined by plaque assay for WR or by immunostaining for VVΔE3L. doi:10.1371/journal.ppat.1000096.g002

approach was carried out as before but with retroviral transduction of ISG15^{+/+} cells, followed by measurements of WR or VVΔE3L viral growth. As shown in Fig. 4, panels C–D, both viruses showed a decrease in infectious virus production in correlation with higher ISG15 expression levels. This experiment supports that ISG15 is a negative regulator of VACV replication.

E3 interacts with ISG15 through its carboxy-terminal domain

It has been described that the influenza B virus protein NS1B inhibits ISGylation after binding through its amino terminal domain to ISG15 [27,43]. To test whether E3 protein, that contains a similar domain to NS1, is able to bind to ISG15 protein, we performed immunoprecipitation (IP) assays in PKR^{+/+} cells using the following different viruses: WR, MVA, VVΔE3L lacking the entire E3L gene, and two deletion mutants VVE3LΔ83N and VVE3LΔ26C with truncated versions of E3L gene at the N and C-terminus [44]. After ISG15 IP, the entire E3 protein binds efficiently to ISG15 and the N-terminal mutant

Δ83N, that lacks 83 aminoacids and the PKR binding domain, binds efficiently to ISG15 (Fig. 5A). In contrast, the C-terminal mutant Δ26C, that lacks 26 aminoacids and the ability to bind dsRNA, does not bind ISG15 (Fig. 5B). We also performed the reverse IP using an anti-E3 antibody and only the E3 protein that lacks the C-terminus fails to be immunoprecipitated (Fig. 5B, left panel). When IP was performed without antibody or using a pre-immune serum as a control, no interaction was observed (Fig. 5B, central panels). To analyze if RNA was involved in E3/ISG15 interaction, we treated the IP complex with RNase just before its loading in the SDS-PAGE, and found that the complex was destroyed, as no interaction was observed with any of the E3 proteins from the different viruses (Fig. 5B, left panel). This result indicate that RNA, and probably dsRNA, has a role as a linking component in the interaction between E3 and ISG15 proteins as its degradation abolishes the binding of both proteins. ISG15/E3 protein interaction was confirmed by confocal microscopy, as WR-, or MVA- or VVE3LΔ83N-infected MEFs showed co-localization between ISG15 and E3, while VVΔE3L- or VVE3LΔ26C-

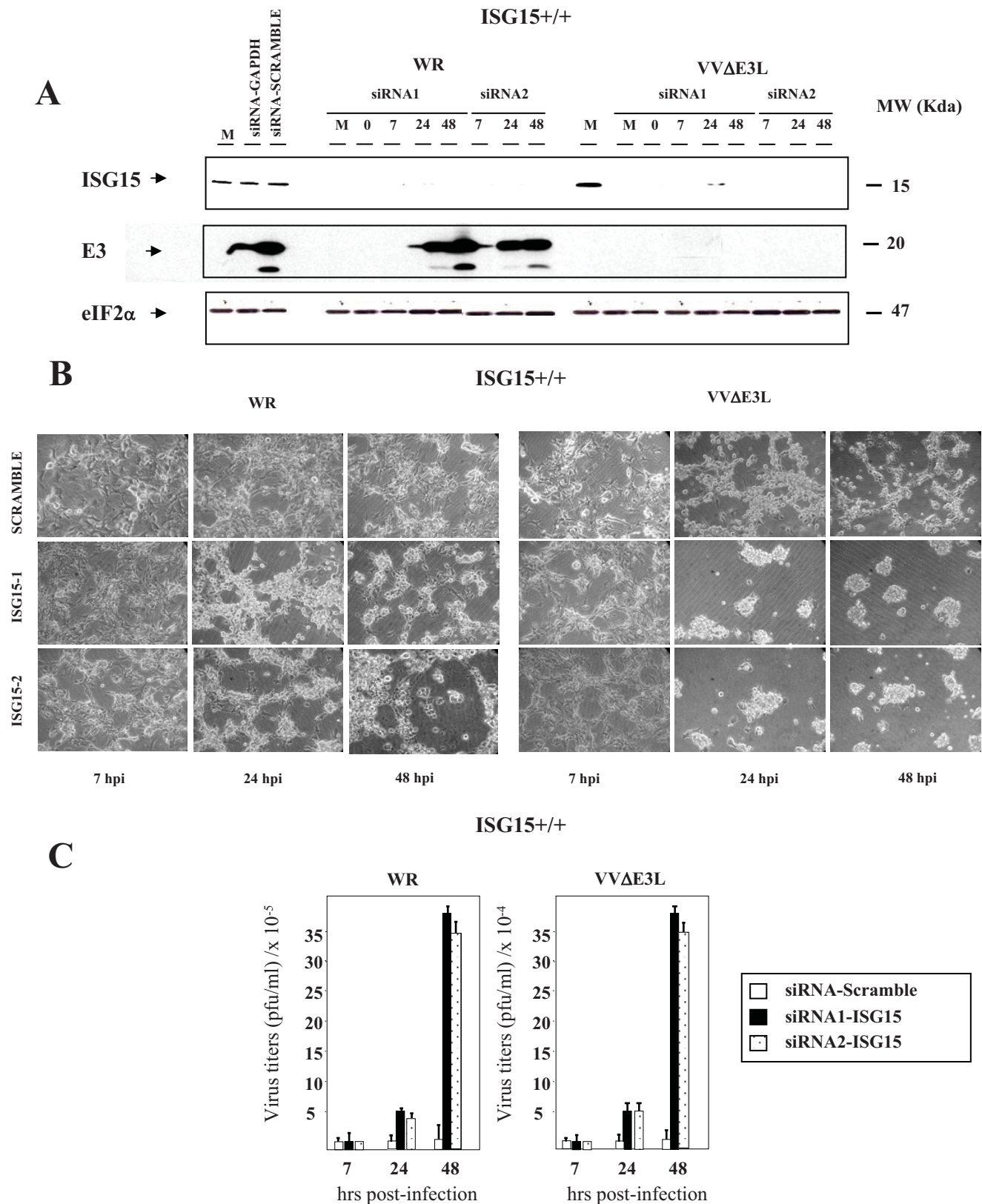


Figure 3. Anti VACV role of ISG15 protein expression using siRNA. MEFs were transfected with ISG15 synthetic siRNA (siRNA1 or siRNA2), scrambled siRNA (used as a negative control) and GAPDH siRNA (used as a positive control) and 24 hours after transfection, siRNA-treated and non-treated control cells were mock- or infected with different WR or VVΔE3L viruses at 0.1 PFU/cell. **A.** Levels of ISG15 were measured by Western-blot using a specific murine anti-ISG15 antibody. Viral protein E3 levels were measured as a control of infection and levels of eIF2α were used as a loading control. **B.** CPE was visualized by phase-contrast microscopy at the indicated times p.i. **C.** Virus growth of WR and VVΔE3L were determined by plaque assay or by immunostaining at the indicated times p.i.
doi:10.1371/journal.ppat.1000096.g003

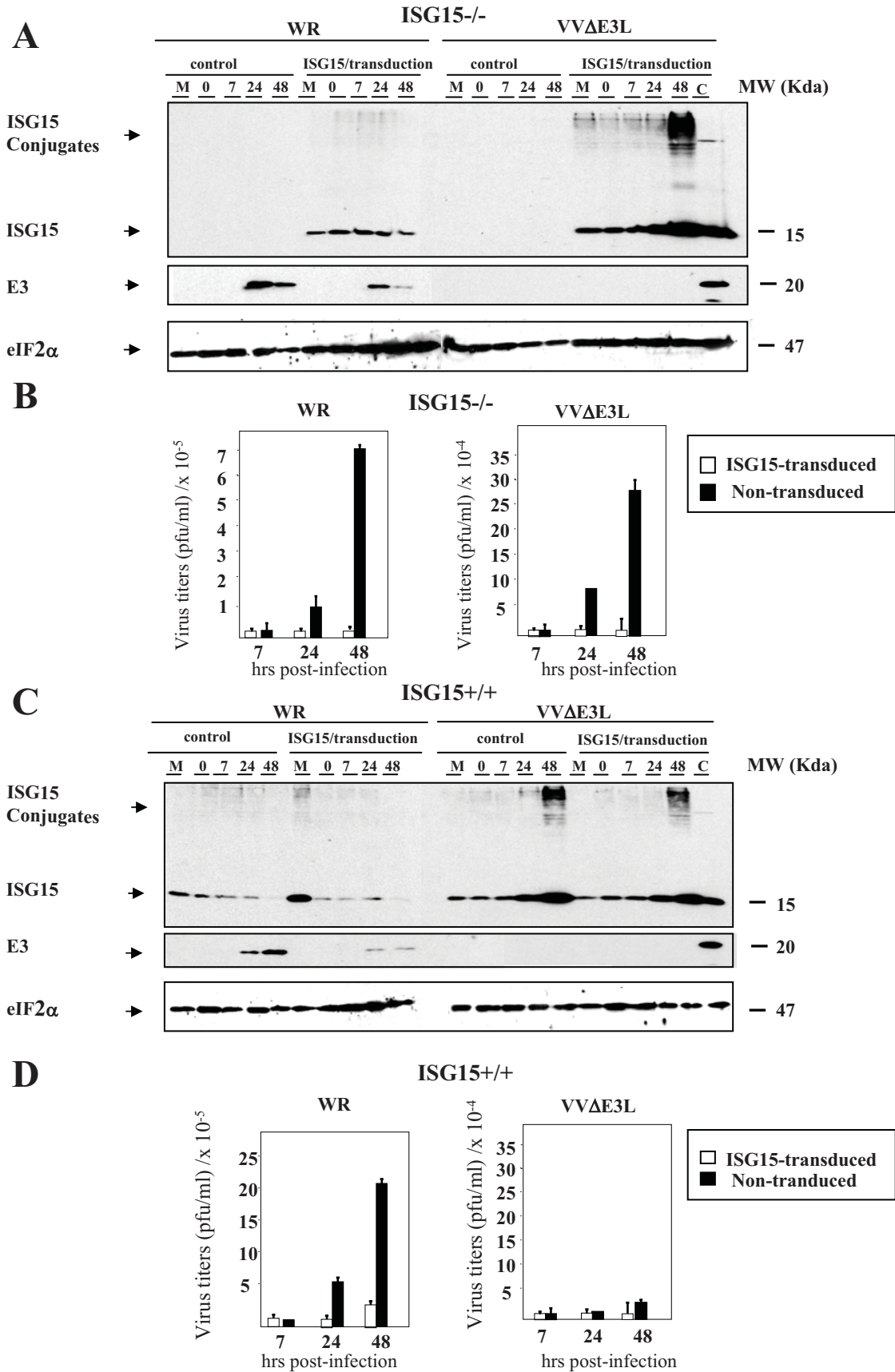


Figure 4. Effect of ISG15 overexpression on virus growth after infection of MEFs with virulent and E3L deletion VACV mutant viruses. A–B. ISG15^{−/−} MEFs were transduced with high-titer viral supernatants corresponding to the pISG15-ires-GFP retroviral vector. Levels of ISG15 were measured by Western blot using a specific murine anti-ISG15 antibody. Viral protein E3 levels were measured as control of infection and levels of eIF2 α were used as a loading control. Virus growth of WR and VV Δ E3L were determined by plaque assay or by immunostaining. **C–D.** ISG15^{+/+} MEFs were transduced as above. Levels of ISG15 were measured by Western blot using a specific murine anti-ISG15 antibody. Viral protein E3 levels were measured as control of infection and levels of eIF2 α were used as a loading control. Virus growth of WR and VV Δ E3L were determined by plaque assay or by immunostaining. Control indicates the non-transduced MEFs.
doi:10.1371/journal.ppat.1000096.g004

infected MEFs did not (Fig. 5C). In addition, we also studied if the presence of PKR was relevant for this interaction by performing both IP and confocal experiments in PKR^{−/−} cells. Both approaches indicate that the interaction between ISG15 and E3 is independent of PKR, as in its absence the entire E3 and the protein

that lacks the amino terminus are able to interact with ISG15 (Fig. 5D). The findings of Fig. 5 reveal that ISG15 binds the E3 protein in a PKR-independent manner and that binding requires the C-terminal domain of E3 spanning the RNA-binding site, which suggests that dsRNA acts as a linker.

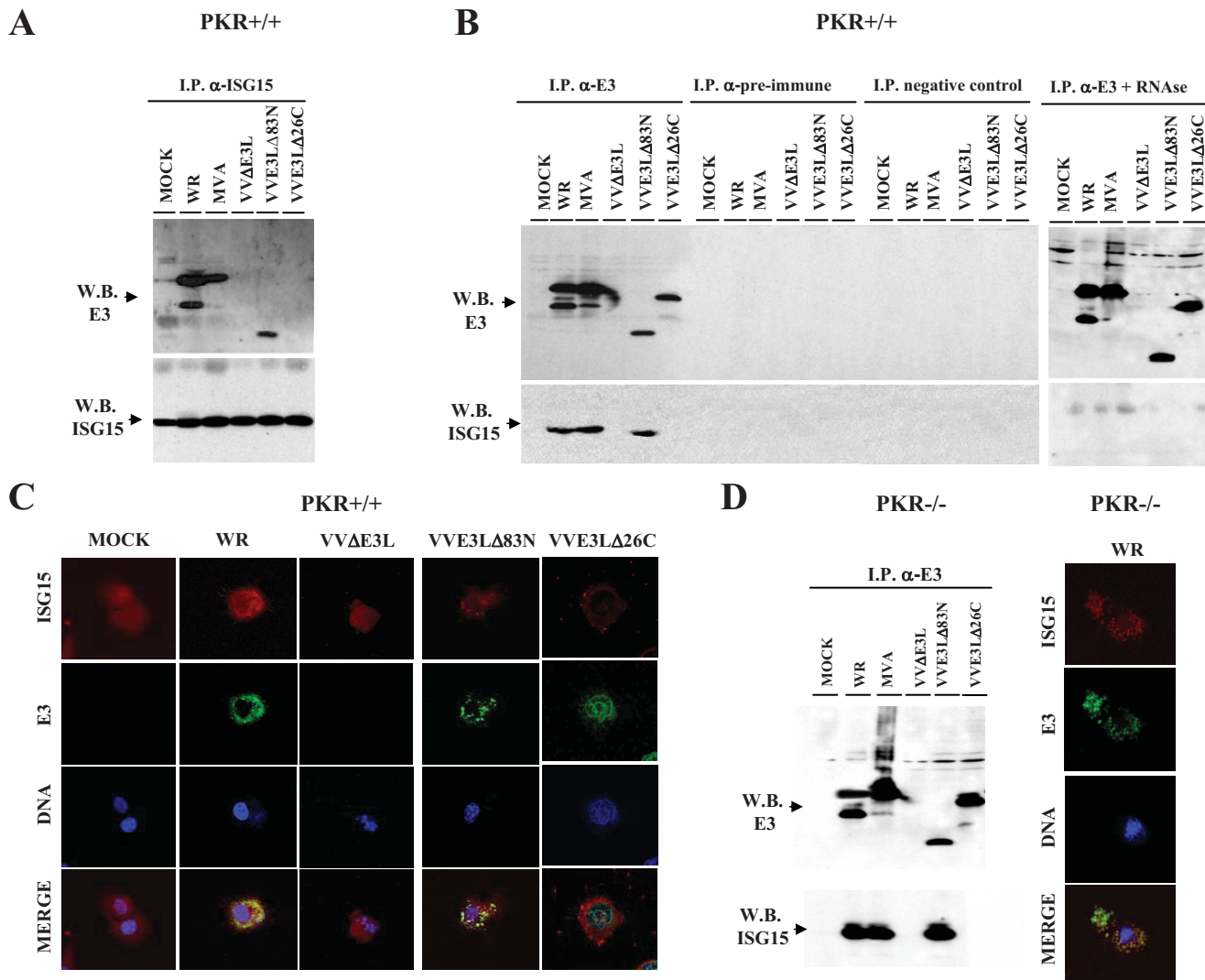


Figure 5. E3 interacts with ISG15 protein. A. PKR^{+/+} MEFs were treated with mouse IFN- α (100 units/ml) during 10 hrs and then infected with 3 PFU/cell of WR, or MVA or VV Δ E3L or VVE3L Δ 83N or VVE3L Δ 26C for 16 hours. Cell extracts were collected at 16 hpi and immunoprecipitated using anti-ISG15 serum, thoroughly washed and immunocomplexes analysed by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting with antiserum to E3 or ISG15. **B.** PKR^{+/+} cells were treated as above and cell extracts were collected at 16 hpi and immunoprecipitated using anti-E3 (with or without RNase treatment (10 μ g for 15 min at room temperature); or without antibody; or using a pre-immune serum, thoroughly washed and immunocomplexes analysed by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting with antiserum to E3 or ISG15. **C.** PKR^{+/+} MEFs treated as in **A** were fixed at 16 h.p.i. and processed for immunofluorescence analysis by confocal microscopy using antibodies directed against ISG15 (red), E3 (green), and TOPRO for staining nuclei (blue). Merged images are presented in the lower panels. Cells were visualized by confocal immunofluorescence microscopy. **D.** Immunoprecipitation and immunofluorescence of PKR^{−/−} MEFs was performed as in **A** or in **C**.
doi:10.1371/journal.ppat.1000096.g005

Enhanced susceptibility of ISG15 KO mice to VVΔE3L infection

To further show that ISG15 is a biological relevant antiviral molecule against VACV infection, we next evaluated the susceptibility of ISG15^{-/-} mice to the virus. Thus, we infected by the intraperitoneal (i.p) route ISG15^{-/-} or ISG15^{+/+} mice with WR at 2×10^7 or with the attenuated VVΔE3L at 10^8 PFU/mouse and scored for prominent indicators of viral pathogenesis (weight loss and mortality). While there was reduced weight loss in ISG15^{-/-} mice, survival was similar between both groups (Fig. 6, panel A and B). However, after VVΔE3L infection the ISG15^{-/-} mice displayed signs of disease within 2 days, characterized by ruffled fur and lack of activity, and 25% of the animals died within 1 to 2 days. Half of the mice infected with VVΔE3L appeared sick at 4 days p.i., and 75% recovered after 7 to 8 days p.i. (Fig. 6C–D). We did not observe virus yields for ISG15^{-/-} or ISG15^{+/+} mice infected with VVΔE3L in liver or spleen, while virus titers were easily obtained in WR infected mice (not shown).

Since the inflammatory response might explain the rapid signs of illness in VVΔE3L infected ISG15 KO mice, we measured serum cytokine levels (IL-6, TNF- α , IL-10, MCP-1, IFN- γ , and IL-12 p 70) at early times post infection. In ISG15^{+/+} mice, IL-6 levels were similar in serum from WR- or VVΔE3L- or mock-infected mice (Fig. 6E). In contrast, ISG15^{-/-} mice infected with VVΔE3L had an 8-fold increase in serum levels of IL-6 compared

with those infected with WR ($P < 0.01$; Fig. 6E). There were no changes in levels of other cytokines analyzed between the groups (not shown).

We also examined the extent of protection conferred in animals pre-immunized with WR or VVΔE3L by i.p route. Thus, pre-immunized mice (as in Fig. 6) were challenged by i.n route with WR at 2×10^7 PFU/mouse. In the case of ISG15^{+/+} and ISG15^{-/-} mice pre-immunized mice with WR, the challenge had little effect on weight loss and signs of illness, clear signs of protection (Fig. 7A–B). However after WR challenge, VVΔE3L pre-immunized ISG15^{-/-} mice developed weight loss and signs of sickness which was not observed in ISG15^{+/+} mice (Fig. 7C–D). These findings revealed a reduced protection to challenge with WR conferred by VVΔE3L pre-immunized KO mice, indicating limited adaptive immune response triggered by VVΔE3L infection of ISG15^{-/-} mice.

The antiviral effect of ISG15 correlates with control of the inflammatory response after VACV infection

Since VVΔE3L pre-immunized ISG15 KO mice developed disease transiently after i.n WR challenge and the upper respiratory tract is a natural route for variola virus infection, we next evaluated disease progression in ISG15^{+/+} and ISG15^{-/-} mice after i.n inoculation with WR and several E3L deletion mutants (VVΔE3L; VVE3LΔ83N and VVE3LΔ26C). The highly

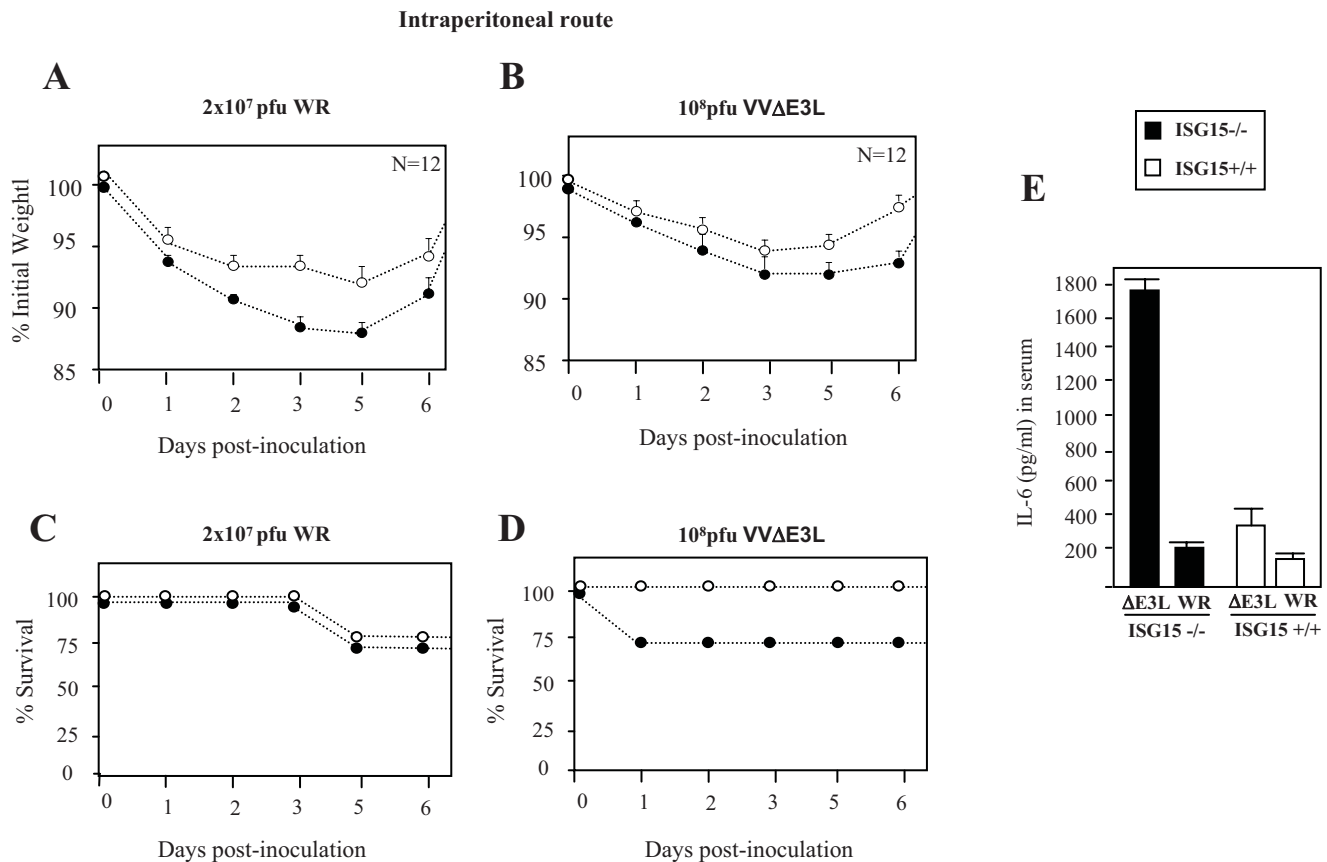


Figure 6. Virulence of WR or VVΔE3L after infection of ISG15^{+/+} and ISG15^{-/-} mice. **A–B.** Mice were inoculated i.p with purified VACV (2×10^7 PFU/mouse) or VVΔE3L (10^8 PFU/mouse). Mice were individually weighed daily, and mean percentage weight loss of each group ($n = 12$) was compared with the weight immediately prior to infection. **C–D.** Survival rate after i.p inoculation with both viruses. Dead animals were scored daily and represented as the percentage of surviving animals. $P \leq 0.01$ in all experiments. **E.** IL-6 measured by ELISA from serum collected at 3 hpi. Results represent the mean \pm SD of pooled samples from 6 mice. doi:10.1371/journal.ppat.1000096.g006

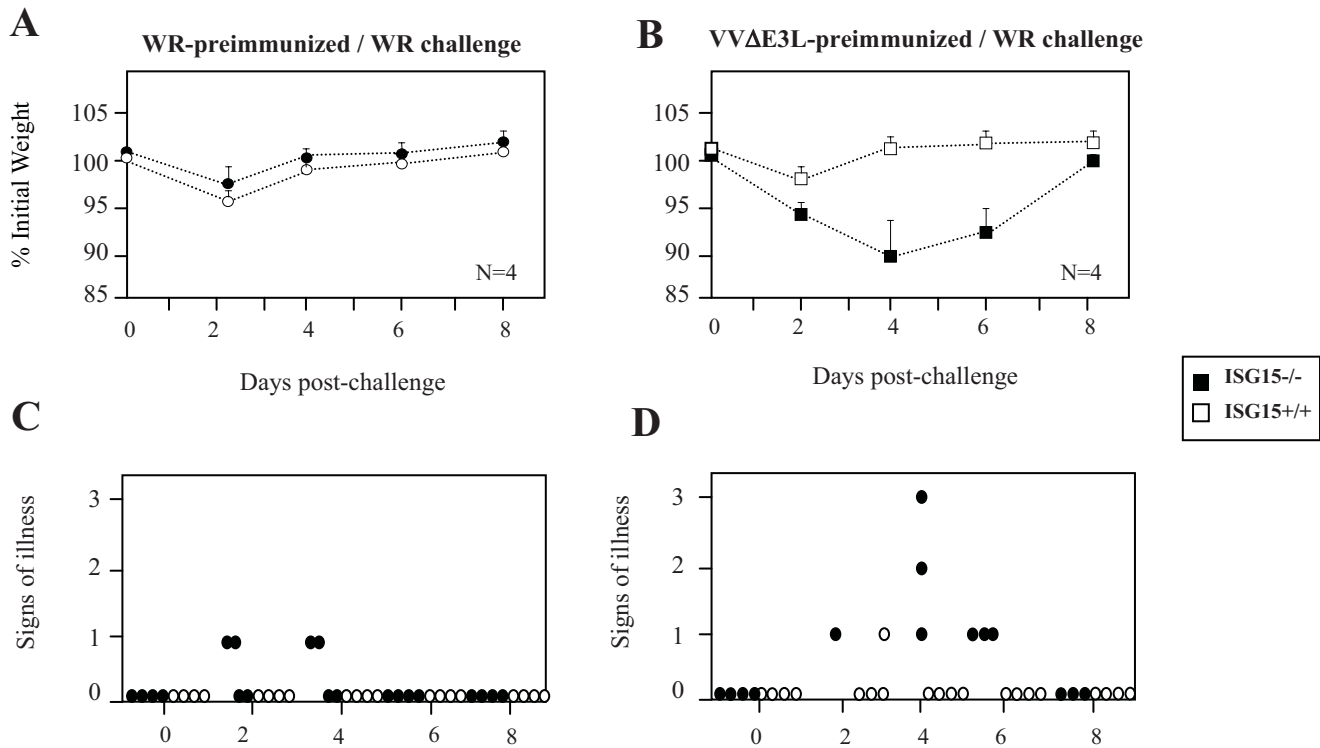


Figure 7. Evaluation of extent of protection of WR or VVΔE3L pre-immunized ISG15^{+/+} and ISG15^{-/-} mice after challenge with WR. Four mice per group were first i.p. immunized with purified WR (2×10^7 PFU/mouse) or VVΔE3L (10^8 PFU/mouse), and 30 days later animals were i.n. challenged with 2×10^7 PFU/mouse of purified WR. **A–B.** Mice were individually weighed daily, and mean percentage weight loss of each group ($n = 4$) was compared with the weight of mice taken prior to the booster. **C–D.** For each mouse signs of illness, such as ruffled fur and lack of activity, were monitored with the time and are given in arbitrary units.
doi:10.1371/journal.ppat.1000096.g007

attenuated MVA strain was included as control. Infected mice were scored for prominent indicators of viral pathogenesis (weight loss, signs of illness and mortality). After WR or VVE3LΔ83N infection, no significant differences in weight loss and signs of illness were observed between ISG15^{-/-} and ISG15^{+/+} mice, although slight differences in weight loss were observed between both groups of mice when inoculated with a lower dose of WR (Fig. 8A, upper panel). Mortality was higher in mice infected with WR, as all mice died within 7 days in the case of WR, while infection with VVE3LΔ83N caused 25% mortality (Fig. 8A–B). However, clear differences were observed after i.n. inoculation of VVΔE3L or VVE3LΔ26C. While ISG15^{+/+} mice did not show signs of illness at any times p.i., ISG15^{-/-} mice infected with VVΔE3L or VVE3LΔ26C showed disease as revealed by clear signs of illness as soon as 2 days and 25% of the animals died. About half of the mice infected with VVΔE3L or VVE3LΔ26C appeared sick at 4 days p.i., but 75% of them recovered after 7 to 8 days p.i. (Fig. 8C).

To analyze the status of ISGylation in the infected mice, lungs were homogenized and conjugation of ISG15 to its target proteins was determined by Western blot. While, ISG15^{-/-} mice do not express ISG15 (Fig. 7A) and lungs homogenates from ISG15^{+/+} mice had similar amounts of the ISG15 protein, conjugation of ISG15 to its targets proteins is enhanced in lung extracts from mice infected with VVΔE3L or VVE3LΔ26C (Fig. 9A). Similar result was also observed in MEFs infected *in vitro* with VVΔE3L where high levels of ISG15 conjugates were clearly observed (Fig. 1A). These findings suggest that E3 blocks conjugation of ISG15 to its target proteins by its carboxy-terminal domain.

The presence of VACV proteins, as determined by Western blot, was more evident in lungs of ISG15^{-/-} in comparison to

ISG15^{+/+} mice infected with WR or the deletion mutant viruses (Fig. 9B). As expected, appearance of virus in lungs correlated with the presence of viral proteins in these tissue extracts (Fig. 9B–C). These results indicate that although the absence of ISG15 has no effect in the mortality of the mice at a high dose of WR inoculation (5×10^6 PFU/mice; Fig. 8A, middle and lower panel), it has an effect in the replication of the WR and E3L mutant viruses, as seen by the different amount of viral protein and virus titers in lung tissues of ISG15^{-/-} versus ISG15^{+/+} mice (Fig. 9B–C).

Histological examination of lung tissue showed that ISG15^{+/+} animals infected with the different mutant viruses had no inflammatory cells infiltrating the lung parenchyma. In contrast, lung sections obtained from ISG15^{-/-} mice infected with VVΔE3L or VVE3LΔ26C presented severe inflammation with alveolar wall thickening and infiltration of inflammatory cells (see enlarged sections in Fig. 10). This phenotype was not observed in WR- or VVE3LΔ83N- infected ISG15^{-/-} mice (Fig. 10). This result indicates that in ISG15^{-/-} mice, pathogenesis and development of an inflammatory response is mediated by the absence of E3 virus expression. This phenotype was maintained after VVΔE3L and VVE3LΔ26C pointing to E3 as a major VACV molecule involved in virus evasion of the IFN-defense ISG15 antiviral protein.

Discussion

Pro-inflammatory and IFN-stimulated genes (ISGs) represent essential components of the innate immune response to viral infection (40). Upon viral entry into cells, ISG induction occurs in two waves: acute, IFN-independent induction of a subset of ISGs

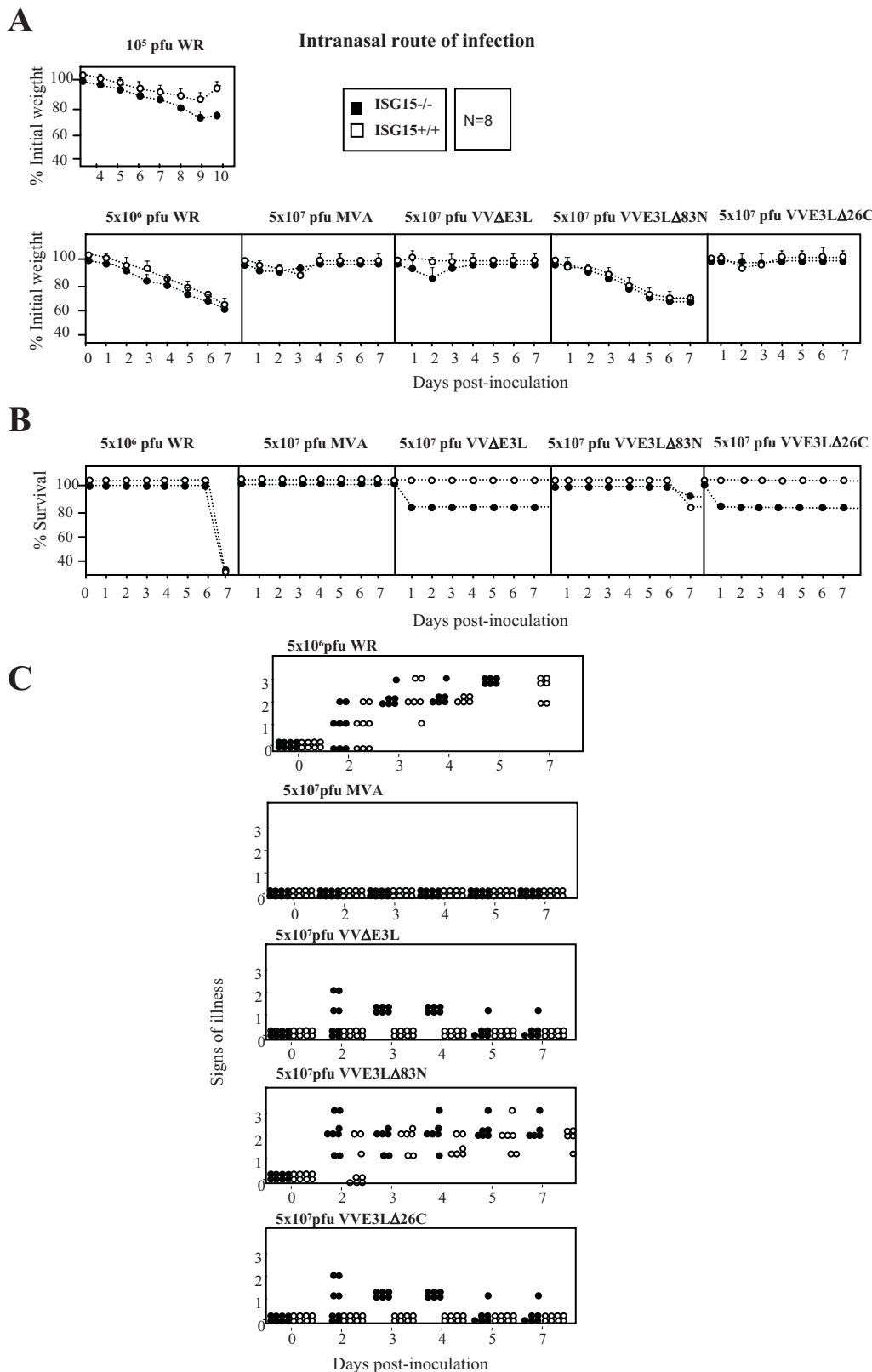


Figure 8. Virulence of different VACV strains after infection of ISG15^{+/+} and ISG15^{-/-} mice. **A.** Mice were inoculated i.n with purified WR (10⁵ or 5x10⁶ PFU/mouse) or VVΔE3L (5x10⁷ PFU/mouse) or VVE3LΔ83N (5x10⁷ PFU/mouse) or VVE3LΔ26C (5x10⁷ PFU/mouse). Mice were individually weighed daily, and mean percentage weight loss of each group (n=8) was compared with weight immediately prior to infection. **B.** Survival rate after i.n inoculation as described in A. Dead animals were scored daily and represented as the percentage of surviving animals. $P \leq 0.01$ in all experiments. **C.** Mice were inoculated as described above and for each individual signs of illness such as ruffled fur and lack of activity were monitored with time and are given in arbitrary units. $P \leq 0.01$ in all experiments. doi:10.1371/journal.ppat.1000096.g008

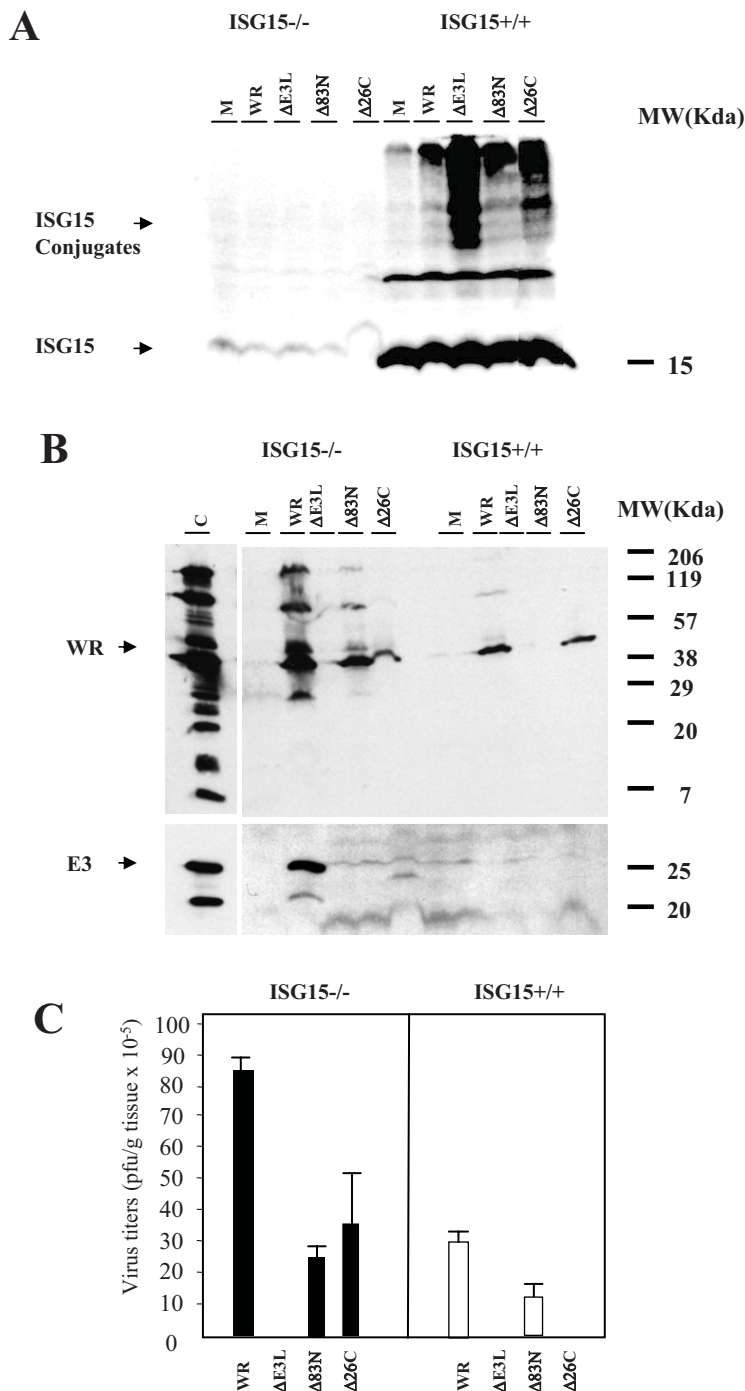


Figure 9. Viral replication of different VACV strains in infected ISG15^{+/+} and ISG15^{-/-} mice. **A–B.** Western blot of ISG15 and of viral proteins in lung homogenates from ISG15^{+/+} and ISG15^{-/-} mice. Animals were i.n. inoculated with purified WR (5×10^6 PFU/mouse) or VVΔE3L (5×10^7 PFU/mouse) or VVΔE3LΔ83N (5×10^7 PFU/mouse) or VVΔE3LΔ26C (5×10^7 PFU/mouse) and immunoblots reacted with specific antibodies to ISG15 and to viral proteins. Each sample represents pools from 2 mice per group. **C.** Lung homogenates were titrated by plaque assay in BSC40 (for WR) or by immunostaining in BHK-21 cells (for VVΔE3L). Each sample represents pools from 2 mice per group. doi:10.1371/journal.ppat.1000096.g009

and delayed, IFN-dependent induction via the production of IFN- α/β during the initial phase. In many viral infections, IFN-independent ISG induction is mediated by the IRF-3 phosphorylation, homodimerization, and nuclear translocation. Activated IRF3, in turn, induces the expression of type I IFN genes, whose products trigger strong induction of a subsets of ISGs, including IFN- β which after its release and ligand-binding to its receptor

then initiates IFN-dependent ISG induction via the IFN receptor and JAK/STAT signaling pathways. IFN-inducible enzymes, like the 2.5 OAS/RNase L system, PKR, and Mx, are the best characterized proteins that mediate antiviral action of IFN. Another protein, ISG15, was first identified as an IFN-stimulated gene whose expression is induced strongly by IFN- α/β treatment and can be detected at low constitutive levels in cells [45]. ISG15

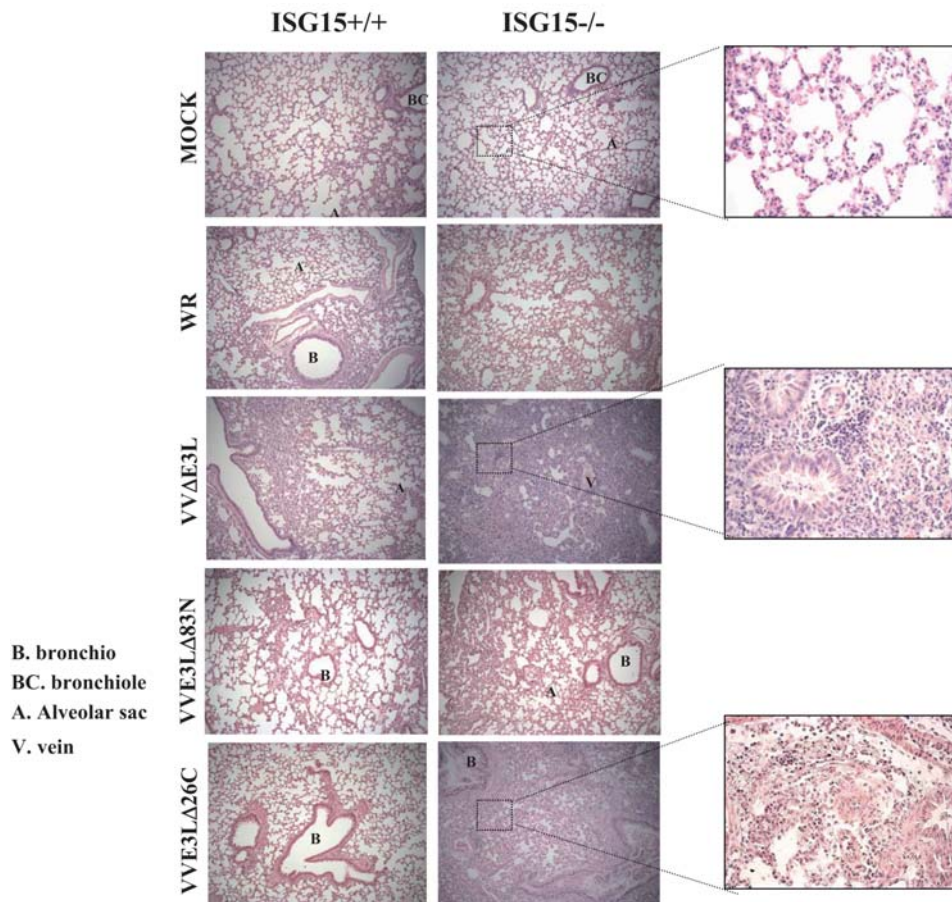


Figure 10. Histopathology of lungs from ISG15^{+/+} and ISG15^{-/-} mice intranasally infected with VACV mutant viruses. Lungs from ISG15^{+/+} and ISG15^{-/-} mice i.n. inoculated with, WR (5×10^6 PFU/mouse) or MVA (5×10^7 PFU/mouse) or VVΔE3L (5×10^7 PFU/mouse) or VVE3LΔ83N (5×10^7 PFU/mouse) or VVE3LΔ26C (5×10^7 PFU/mouse) were resected, sectioned and stained with hematoxylin and eosin. For each group of animals representative fields are shown at a magnification of $40\times$ (left panels) and $100\times$ (right panels). B. Bronchio, BC. Bronchiole, A. Alveolar sac, V. Vein.

doi:10.1371/journal.ppat.1000096.g010

modifies several important molecules and affects type I IFN signal transduction; ISG15 expression is markedly increased following viral infection [14, 30, 49], and many viruses encode inhibitors of the IFN-transduction pathway or specific inhibitors of ISG to avoid deleterious effects triggered by these cytokines.

Among animal viruses, the poxvirus family contains a large array of genes which are used by the virus to evade host immune responses. VACV encodes multiple proteins that interfere with complement regulatory proteins, with many cytokines and chemokines, with TLRs (Toll like receptors) and signal transduction pathways, with apoptosis, and others [46]. One of the VACV proteins with strong inhibitory activity of IFN-induced pathways is E3 [47]. E3 represses the host cell antiviral response inhibiting both PKR and RNaseL, which trigger global inhibition of protein synthesis and virus replication [35,36,37]. In addition, E3 blocks the activation of IRF3 [40,41], and effectively prevents the first wave of type I IFN synthesis. E3 has two domains, an N-terminal involved in the direct inhibition of PKR, its nuclear localization, and Z-DNA binding [34,48,49,50], and the C-terminal that contains the dsRNA-binding domain required for IFN-resistance and for the broad host range phenotype of the virus [44,51]. It has been described that VACV lacking E3 (VVΔE3L) replicates in PKR or RNaseL deficient cells [40].

Through the use of microarrays we identified the gene ISG15 as being induced in the course of infection of human cells with different strains of VACV [28,29,30]. The attenuated mutant VVΔE3L also produces an increase in ISG15 messenger levels [31]. The reason for the induction of ISG15 mRNA levels by attenuated viruses (Fig. 1) is probably due to the activation of several cellular signal transduction cascades and of host transcription factors [28,30,31]. Since MVA and NYVAC strains contain the E3L gene, this upregulation may be independent of E3 expression with induction being likely due to the increase in IFN- β levels.

In this study we showed that a VACV mutant lacking E3, which cannot grow in ISG15 WT cells, is able to replicate both in MEFs cells derived from ISG15 KO mice or in ISG15 silenced cells. In addition viral titers also increase in the absence of ISG15 indicating that ISG15 has an essential role against infection of VACV. During infection of MEFs from ISG15 KO or ISG15 depleted cells, the presence of E3 enhances viral production since the WR titers are greater than those after infection with the VVΔE3L mutant virus. One explanation of this phenotype is that the mutant virus lacking E3 triggers apoptosis through PKR activation which, in turn, reduces virus production as previously described [52]. The role of ISG15 in VACV replication was also supported by the more abundant VACV infectious virus and viral

proteins produced in lungs of ISG15^{-/-} mice compared with lungs of ISG15^{+/+} mice after infection with WR or with the E3L deletion mutant viruses (Fig. 9B–C).

While the depletion of ISG15 has an effect on VVΔE3L mutant phenotype and restores virus growth, over-expression of ISG15 in ISG15^{-/-} murine cells using a retroviral transduction system revert the restricted VVΔE3L viral growth. Over-expression of ISG15 also reduces markedly WR titers reinforcing the idea that ISG15 plays a role in the control of VACV replication.

Inhibition of ISG15 function by VACV is likely due to its interaction with VACV E3, as shown by IP and confocal analyses. This interaction with ISG15 occurs independently of PKR, through the C-terminal region of E3 and requires RNA. We have shown that ISG15 controls the *in vitro* replication of VACV in a PKR-independent manner, as WR and VVΔE3L titers do not increase in murine PKR^{-/-} cells in comparison to those observed in PKR^{+/+}. While in murine cells VVΔE3L is able to replicate in a PKR-independent manner, as also described in MEFs lacking RNase L [53], in human HeLa cells with PKR expression suppressed by siRNA, the mutant virus is able to grow [40]. The differences in cell origin might explain the distinct effect of the IFN system in the control of VACV replication.

The mutant VVΔE3L virus that was able to replicate in ISG15^{-/-} MEFs (Fig. 2) did not replicate in ISG15 KO mice (Fig. 7), but surprisingly infection with VVΔE3L provokes sickness and mortality only in ISG15^{-/-} mice. This was probably related to the strong inflammatory response triggered by the mutant in ISG15 KO mice, as observed by the increased levels of IL-6 in serum (Fig. 4E). Although the biological relevance of this observation remains to be established, it can be suggested, in view of the functions assigned to ISG15 in the innate immune response [54], that this molecule plays a role as regulator of IFN-triggered innate responses during VACV infection. It will be of interest to know the type of innate response triggered in ISG15 KO mice infected with VVΔE3L.

The inability of VVΔE3L to cause significant disease in WT mice is presumably due, at least in part, to induction of type I IFN that, in turn, leads to up-regulation of antiviral proteins, such as PKR and 2–5 OAS/RNaseL system. The mutant virus that lacks the C terminus of E3L gene involved in the dsRNA sequestration (VVE3LΔ26C) is completely attenuated in WT mice; however deletion of the N terminus (VVE3LΔ83N) reduces pathogenesis 500- to 5,000-fold [33,48]. We extended these *in vivo* studies using the i.n route and compared WR and E3L mutant viruses in WT and ISG15 KO mice. We observed that only after VVΔE3L or VVE3LΔ26C inoculation (i.n), the mortality of mice was increased by the absence of ISG15 (Fig. 6). In the case of WR or VVE3LΔ83N, there were no differences in mortality of both viruses in ISG15 KO in comparison to WT mice although viral replication was enhanced in the lungs of ISG15^{-/-} in comparison to ISG15^{+/+} mice. One explanation is that ISG15 is made non functional after infection with these viruses, because the carboxy-terminal domain of E3 binds to ISG15 and blocks its activity. These observations are in correlation with the reduced presence of conjugates in lungs of WT mice infected with WR or VVE3LΔ83N, compared with infection by VVΔE3L or VVE3LΔ26C. Although lung homogenates presented similar amounts of ISG15 protein, the conjugation of ISG15 to its targets proteins, was greatly enhanced after infection with VVΔE3L or VVE3LΔ26C (Fig. 7). This evidence suggests that inhibition of conjugation of ISG15 is mediated by E3 and this inhibition requires the presence of the dsRNA binding domain. Similar result was also observed in MEFs infected *in vitro* with VVΔE3L where high levels of ISG15 conjugates were clearly observed (Fig. 1A).

The cause of mortality of ISG15 KO mice after infection with VVΔE3L or VVE3LΔ26C was a massive inflammation of lungs with alveolar wall thickening and infiltration of cells (Fig. 8). These results indicate a role of ISG15 in the control of an inflammatory response by regulating cytokine levels.

Cytokine and chemokine release occurs rapidly in response to virus infection, with the aim of recruiting inflammatory leukocytes in order to limit virus replication and spread, and to induce adaptive immunity. However, prolonged expression of chemokines in the context of viral infections may be detrimental to the host. We find that in the absence of ISG15, infection with VVΔE3L produces an increase of IL-6 that correlates with short-term morbidity and complications that include pulmonary function abnormalities. Although the mechanisms of this up-regulation remains to be established, it can be speculated in view of the functions assigned to ISG15 that it might be involved in the regulation of cytokine signal transduction, through the stabilization of specific signalling components that facilitate the development of a correct innate immune response. In this sense a family of intracellular proteins called suppressors of cytokine signalling (SOCS) are essential for the regulation of cytokine expression having a critical role in the regulation of the innate response. Considering that SOCS-1 and SOCS-3 negatively regulate the IFN-induced signal cascade, and VACV E3 protein inhibits the type I IFN response, it is possible that E3 or other viral proteins may regulate the IFN response by affecting SOCS protein expression regulating the ISG15 activity by an unknown mechanism. We have previously demonstrated that although WR provokes a general downregulation of cellular mRNAs, there are a discrete number of human genes that are induced selectively during the course of VACV infection. A variety of these upregulated genes encode different members of the SOCS family [29] indicating that probably VACV may modify SOCS protein expression to manipulate the cytokine pathway and the antiviral host response. This strategy may be used to reduce the efficacy of innate and acquired immune responses to infection. However, WR modification of cytokine or chemokine responses may also be a mechanism to recruit new targets for infection, or provide new niches for infection. It has been described that over-expression of HCV core protein inhibits IFN signalling and induces SOCS-3 expression. SOCS-1 and SOCS-3 proteins have been reported to inhibit IFN-induced activation of the JAK-STAT pathway and expression of antiviral proteins, such as MxA [55].

There are similarities between the functions of VACV E3 and the NS1 dsRNA-binding protein of influenza virus. NS1 blocks IRF3 phosphorylation and IFNβ mRNA induction [56]. In addition, NS1 is an inhibitor of PKR, suggesting that dsRNA sequestration is a strategy used by both RNA and DNA viruses to evade the IFN induction and action [57]. Furthermore NS1B binds and blocks ISG15 protein inhibiting the ISGylation. The region of the NS1B protein that is required for this inhibition includes the domain that binds dsRNA. VACV may have a similar mechanism of influenza NS1 to evade ISG15 action as well.

We conclude that the cellular ISG15 protein has an essential role in VACV replication, acting as a negative feedback regulator of the cytokine signalling pathway and regulating in this way the innate response. VACV has therefore developed a mechanism to counteract this antiviral host response through E3. Because VVΔE3L is not lethal to ISG15^{+/+} mice lacking PKR, RNase L, and Mx1 [40], there must be an additional IFN-induced antiviral pathway(s) effective against viruses, in which ISG15 should play an essential role. Understanding the host responses triggered by ISG15 and virus mechanisms of escape is necessary for development of therapies against important human pathogens.

Materials and Methods

Cells, viruses and infection conditions

HeLa cells (ATCC) were cultured in Dulbecco's medium (DMEM) supplemented with 10% newborn bovine serum (NCS) and antibiotics (Gibco, <http://www.invitrogen.com>). ISG15^{-/-} cells and their wild type counterpart were generated by Osiak et al [58] and cultured in DMEM with 10% fetal calf serum (FCS). PKR^{-/-} and their wild type counterpart [59] were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% FCS. VACV wild-type Western Reserve strain (WR) was grown on monkey BSC-40 cells (African green monkey kidney cells), purified by sucrose gradient banding as described [24] and titrated in BSC-40 cells. MVA and NYVAC, as well as VACV mutant of E3L were grown in Baby hamster kidney cells (BHK-21), sucrose purified and titrated in BHK-21 cells by immunostaining as previously described [60]. VACV constructs deleted of E3L (VVAE3L), of the first 83 N-terminal amino acids of E3L (VVE3LΔ83N), or of the last 26 C-terminal amino acids of E3L (VVE3LΔ26C) were kindly provided by B. L. Jacobs (University of Arizona, USA) [44,61].

Quantitative Real-Time RT-PCR

RNA (1 µg) was reverse-transcribed using the Superscript first-strand synthesis system for reverse transcription-PCR (RT-PCR) (<http://www.invitrogen.com>). A 1:40 dilution of the RT reaction mixture was used for quantitative PCR. Primers and probe sets used to amplify ISG15 was purchased from (<http://www.appliedbiosystems.com>). RT-PCR reactions were performed according to Assay-on-Demand, optimized to work with TaqMan Universal PCR MasterMix, No AmpErase UNG, as described [28]. All samples were assayed in duplicate. Threshold cycle (Ct) values were used to plot a standard curve in which Ct decreased in linear proportion to the log of the template copy number. The correlation values of standard curves were always >99%.

Cellular viability assay

Cells were grown in 96-well plates to confluency and infected with different VACV or VVAE3L viruses at the indicated multiplicity of infection (MOI) from 0.01 to 10 PFU/cell. At 24 hours post-infection (hpi), the medium was removed and cytotoxicity was determined by crystal violet staining as described previously [62]. The percentage of viable cells was calculated assuming the survival rate of uninfected cells to be 100%.

Immunoblotting

Murine embryonic fibroblasts (MEFs) were infected in 6-well plates with WR, or MVA, or NYVAC, or VVAE3L and collected at indicated hpi in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M NaCl, 10% NP40, 1% SDS). Equal amounts of protein lysates (100 µg) were separated by 14% or 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to nitrocellulose membranes and incubated with antibodies, anti-ISG15 [58], -actin (<http://www.sigmaaldrich.com>), -E3 (kindly provided by B.L. Jacobs) followed by peroxidase-conjugated mouse or rabbit secondary antibodies. For the *in vivo* measurement of ISG15, parental or ISG15^{-/-} mice were infected with WR, VVAE3L, VVE3LΔ83N or VVE3LΔ26C at the multiplicity indicated. Lung samples were homogenized and mixed with SDS loading buffer and boiled for 10 min before Western blot analysis. ISG15 expression was detected as previously described with a rabbit antiserum against ISG15 [58] followed by peroxidase-conjugated rabbit secondary antibodies. Blots were developed using ECL (<http://www.amersham.com>).

Immunoprecipitation analysis

Confluent MEF cells grown in 100 mm plates were treated with mouse IFN-α (100 units/ml) during 10 hrs and infected at 3 PFU/cell for 16 h with the recombinant viruses indicated and cells were collected and lysed and clarified supernatant was incubated with 20 µg of anti-mouse IP beads (<http://www.ebioscience.com>) previously incubated with a rabbit antiserum against ISG15 [58] or against E3 respectively. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE followed by immunoblot with the antibody anti-E3 (kindly provided by B.L. Jacobs). The RNase treatment consisted in an incubation of the IP extracts with 10 µg of RNase for 15 min at room temperature.

Viral inoculation of mice and sample collection

The origin of ISG15^{-/-} mice has been described [58]. ISG15^{-/-} and control wild type (WT) C57/BL-6 mice (6 to 10 weeks old) were immunized i.n in 25 µl PBS with VACV at 5×10⁶ or 10⁵ PFU/mouse or with VVAE3L or VVE3LΔ83N or VVE3LΔ26 at 5×10⁸ PFU/mouse. The i.p inoculation was with VACV at 2×10⁷ or VVAE3L at 10⁸ PFU/mouse in 200 µl PBS. Animals were sacrificed at various times post-inoculation and spleen, liver, ovaries and lungs were removed, washed with sterile PBS, and stored at -70°C. Serum was obtained by retro-orbital bleedings 3 hours post-inoculation and was allowed to clot 1 hour at 37°C; after leaving samples at 4°C overnight, they were spun down in a microcentrifuge, and serum removed and stored at -20°C.

Cytokine Analysis

Secreted IL-6 from serum of mice infected i.p with WR or VVAE3L at the indicated days was measured with the quantitative human IL-6 (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Captured IL-6 was quantified at 450 nm with a spectrophotometer. Triplicate samples were measured in two independent experiments. Alternatively, serum cytokine levels were analyzed for IL-6, TNF, IL-10, MCP-1, IFN-γ, and IL-12 p 70 by using the cytometric bead array mouse inflammation kit as indicated by the manufacturer (<http://www.BDBiosciences.com>).

Transfection of ISG15 siRNA

ISG15-synthetic siRNA (s79221 and s79223), scrambled siRNA (used as a negative control; s4390843) and GAPDH siRNA (used as a positive control; s4390849) were purchased from Applied Biosystems and resuspended in RNase-free H₂O. Transfection of siRNAs targeting each mRNA was carried out according to the manufacturer's instructions with some modifications. Murine ISG15^{+/+}, PKR^{+/+} and PKR^{-/-} embryonic fibroblasts were plated in 12-well plates 18 to 24 h before transfection. On the day of transfection, RNA-lipid complexes were introduced into each well of cells (20 nM RNA) by using siPORT Amine transfection reagent (<http://www.ambion.com>). The effect of specific siRNAs on target protein abundance was assessed by Western-blot. Twenty-four hours after transfection, siRNA-treated and non-treated control cells were mock-infected or infected with different WR or VVAE3L viruses at 0.1 PFU/cell and CPE were visualized by phase-contrast microscopy at the indicated times p.i.

Ectopic ISG15 protein expression by retroviral transduction

ISG15^{+/+} and ISG15^{-/-} MEFs were transduced with high-titer viral supernatants corresponding to the pISG15-ires-GFP retroviral vector obtained as described [63]. Supernatants were collected at 48 h after transfection, filtered through a 0.45-µm-pore-size filter, and supplemented with complete DMEM medium

+10% FCS before addition to growing MEFs. This protocol was repeated each 12 hours three times in presence of polybrene. The transduction efficiency was evaluated by Western-blot. Twenty-four hours after retroviral infection treated and non-treated control cells were mock-infected or infected with different VACV or VVAE3L viruses at 0.1 PFU/cell and and CPE were visualized by phase-contrast microscopy at the indicated times p.i.

Immunofluorescence

PKR^{+/+} and PKR^{-/-} embryonic murine fibroblasts cultured on coverslips were infected with the viruses indicated. At 16 hpi cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) and permeabilized (10 min, room temperature) with 0.1% Triton X-100 in PBS, washed, and blocked with 20% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Cells were incubated (1 h, 37°C) with anti-ISG15, -E3 (mouse antibody kindly provided by B. Moss); coverslips were washed extensively with PBS and further incubated (1 h, 37°C) with ToPro (<http://www.molecularprobes.com>) and appropriate fluorescein- or Texas Red-conjugated isotype-specific secondary antibodies. After washing with PBS, coverslips were mounted on microscope slides using Mowiol (<http://www.calbiochem.com>). Images were obtained using a Bio-Rad Radiance 2100 Confocal Laser microscope (<http://www.biorad.com>).

References

- Liu Y, Wolff KC, Jacobs BL, Samuel CE (2001) Vaccinia virus E3L interferon resistance protein inhibits the interferon-induced adenosine deaminase A-to-I editing activity. *Virology* 289: 378–387.
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5: 834–839.
- Au WC, Moore PA, Lowther W, Juang YT, Pitha PM (1995) Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11657–11661.
- Zhao C, Denison C, Huibregtse JM, Gygi S, Krug RM (2005) Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10200–10205.
- Narasimhan J, Potter JL, Haas AL (1996) Conjugation of the 15-kDa interferon-induced ubiquitin homolog is distinct from that of ubiquitin. *J Biol Chem* 271: 324–330.
- Narasimhan J, Wang M, Fu Z, Klein JM, Haas AL, et al. (2005) Crystal structure of the interferon-induced ubiquitin-like protein ISG15. *J Biol Chem* 280: 27356–27365.
- Liu YC, Penninger J, Karin M (2005) Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol* 5: 941–952.
- Zhao C, Beaudenon SL, Kelley ML, Waddell MB, Yuan W, et al. (2004) The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN- α /beta-induced ubiquitin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7578–7582.
- Dastur A, Beaudenon S, Kelley M, Krug RM, Huibregtse JM (2006) Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells. *J Biol Chem* 281: 4334–4338.
- Kim KI, Yan M, Malakhova O, Luo JK, Shen MF, et al. (2006) Ube1L and protein ISGylation are not essential for α /beta interferon signaling. *Mol Cell Biol* 26: 472–479.
- Tokarz S, Berset C, La Rue J, Friedman K, Nakayama K, et al. (2004) The ISG15 isopeptidase UBP43 is regulated by proteolysis via the SCFSkp2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 279: 46424–46430.
- Malakhov MP, Malakhova OA, Kim KI, Ritchie KJ, Zhang DE (2002) UBP43 (USP18) specifically removes ISG15 from conjugated proteins. *J Biol Chem* 277: 9976–9981.
- Kim KI, Zhang DE (2005) UBP43, an ISG15-specific deconjugating enzyme: expression, purification, and enzymatic assays. *Methods Enzymol* 398: 491–499.
- Ritchie KJ, Hahn CS, Kim KI, Yan M, Rosario D, et al. (2004) Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection. *Nat Med* 10: 1374–1378.
- Pitha-Rowe I, Hassel BA, Dmitrovsky E (2004) Involvement of UBE1L in ISG15 conjugation during retinoid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia. *J Biol Chem* 279: 18178–18187.
- Liu M, Li XL, Hassel BA (2003) Proteasomes modulate conjugation to the ubiquitin-like protein, ISG15. *J Biol Chem* 278: 1594–1602.
- Yeh ET, Gong L, Kamitani T (2000) Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* 248: 1–14.
- Arimoto KI, Konishi H, Shimotohno K (2007) UbcH8 regulates ubiquitin and ISG15 conjugation to RIG-I. *Mol Immunol*.
- Nielsch U, Pine R, Zimmer SG, Babiss LE (1992) Induced expression of the endogenous beta interferon gene in adenovirus type 5-transformed rat fibroblasts. *J Virol* 66: 1884–1890.
- Loo YM, Owen DM, Li K, Erickson AK, Johnson CL, et al. (2006) Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6001–6006.
- Lenschow DJ, Giannakopoulos NV, Gunn IJ, Johnston C, O'Guin AK, et al. (2005) Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection in vivo. *J Virol* 79: 13974–13983.
- Nicholl MJ, Robinson LH, Preston CM (2000) Activation of cellular interferon-responsive genes after infection of human cells with herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 81: 2215–2218.
- Behr M, Schieferdecker K, Buhr P, Buter M, Petsophonsakul W, et al. (2001) Interferon-stimulated response element (ISRE)-binding protein complex DRAFI is activated in Sindbis virus (HR)-infected cells. *J Interferon Cytokine Res* 21: 981–990.
- MacQuillan GC, Mamotte C, Reed WD, Jeffrey GP, Allan JE (2003) Upregulation of endogenous intrahepatic interferon stimulated genes during chronic hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 70: 219–227.
- Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, Giannakopoulos NV, Lutz A, et al. (2007) IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1371–1376.
- Okumura A, Lu G, Pitha-Rowe I, Pitha PM (2006) Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 1440–1445.
- Yuan W, Krug RM (2001) Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *Embo J* 20: 362–371.
- Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Conde R, Pascual-Montano A, Harshman K, et al. (2004) Microarray analysis reveals characteristic changes of host cell gene expression in response to attenuated modified vaccinia virus Ankara infection of human HeLa cells. *J Virol* 78: 5820–5834.
- Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Pascual-Montano A, Munoz M, Harshman K, et al. (2003) Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells. *J Virol* 77: 6493–6506.
- Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Pascual-Montano A, Najera JL, Zaballós A, et al. (2006) Host response to the attenuated poxvirus vector NYVAC: upregulation of apoptotic genes and NF- κ B-responsive genes in infected HeLa cells. *J Virol* 80: 985–998.
- Langland JO, Kash JC, Carter V, Thomas MJ, Katze MG, et al. (2006) Suppression of proinflammatory signal transduction and gene expression by the dual nucleic acid binding domains of the vaccinia virus E3L proteins. *J Virol* 80: 10083–10095.
- Chang HW, Watson JC, Jacobs BL (1992) The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4825–4829.

Immunohistochemistry

Formalin-fixed lung from mice mock-infected or infected with WR, VVAE3L, VVE3L•83N or VVE3L•26 was resected, sectioned and stained with both hematoxylin and eosin as previously described [64].

Supporting Information

Figure S1 Effect of ISG15 overexpression on virus cytotoxicity after infection of MEFs with virulent and E3L deletion VACV mutant viruses. A–B. ISG15^{-/-} or ISG15^{+/+} MEFs were transduced with high-titer viral supernatants corresponding to the pISG15-ires-GFP retroviral vector. CPE was visualized by phase-contrast microscopy at the indicated times p.i.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000096.s001 (0.68 MB PDF)

Table S1 Levels of ISG15 mRNA detected by quantitative real-time RT-PCR after infection of HeLa cells with several VACV mutants.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000096.s002 (0.02 MB PDF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SG ME. Performed the experiments: SG AC. Analyzed the data: SG ME. Contributed reagents/materials/analysis tools: KK IH ME. Wrote the paper: SG.

33. Brandt TA, Jacobs BL (2001) Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. *J Virol* 75: 850–856.
34. Langland JO, Jacobs BL (2004) Inhibition of PKR by vaccinia virus: role of the N- and C-terminal domains of E3L. *Virology* 324: 419–429.
35. Rivas C, Gil J, Melkova Z, Esteban M, Diaz-Guerra M (1998) Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)-induced 2–5A synthetase enzyme. *Virology* 243: 406–414.
36. Wreschner DH, Silverman RH, James TC, Gilbert CS, Kerr IM (1982) Affinity labelling and characterization of the ppp(A2'p)nA-dependent endoribonuclease from different mammalian sources. *Eur J Biochem* 124: 261–268.
37. Kerr IM, Cayley PJ, Silverman RH, Knight M (1982) The antiviral action of interferon. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 299: 59–67.
38. Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Garcia MA, Zaballo A, Esteban M (2006) Human gene profiling in response to the active protein kinase, interferon-induced serine/threonine protein kinase (PKR), in infected cells. Involvement of the transcription factor ATF-3 IN PKR-induced apoptosis. *J Biol Chem* 281: 18734–18745.
39. Malathi K, Paranjape JM, Bulanov E, Shim M, Guenther-Johnson JM, et al. (2005) A transcriptional signaling pathway in the IFN system mediated by 2'–5'-oligoadenylate activation of RNase L. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14533–14538.
40. Xiang Y, Condit RC, Vijaysri S, Jacobs B, Williams BR, et al. (2002) Blockade of interferon induction and action by the E3L double-stranded RNA binding proteins of vaccinia virus. *J Virol* 76: 5251–5259.
41. Smith EJ, Marie I, Prakash A, Garcia-Sastre A, Levy DE (2001) IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or Ikappa B kinase but is blocked by Vaccinia virus E3L protein. *J Biol Chem* 276: 8951–8957.
42. Deng L, Dai P, Ding W, Granstein RD, Shuman S (2006) Vaccinia virus infection attenuates innate immune responses and antigen presentation by epidermal dendritic cells. *J Virol* 80: 9977–9987.
43. Yuan W, Aramini JM, Montelione GT, Krug RM (2002) Structural basis for ubiquitin-like ISG 15 protein binding to the NS1 protein of influenza B virus: a protein-protein interaction function that is not shared by the corresponding N-terminal domain of the NS1 protein of influenza A virus. *Virology* 304: 291–301.
44. Chang HW, Jacobs BL (1993) Identification of a conserved motif that is necessary for binding of the vaccinia virus E3L gene products to double-stranded RNA. *Virology* 194: 537–547.
45. Loeb KR, Haas AL (1992) The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. *J Biol Chem* 267: 7806–7813.
46. Smith VP, Alcamí A (2002) Inhibition of interferons by ectromelia virus. *J Virol* 76: 1124–1134.
47. Shors ST, Beattie E, Paoletti E, Tartaglia J, Jacobs BL (1998) Role of the vaccinia virus E3L and K3L gene products in rescue of VSV and EMCV from the effects of IFN- α . *J Interferon Cytokine Res* 18: 721–729.
48. Kim YG, Muralinath M, Brandt T, Percy M, Hauns K, et al. (2003) A role for Z-DNA binding in vaccinia virus pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6974–6979.
49. Kim YG, Lowenhaupt K, Oh DB, Kim KK, Rich A (2004) Evidence that vaccinia virulence factor E3L binds to Z-DNA in vivo: Implications for development of a therapy for poxvirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1514–1518.
50. Romano PR, Zhang F, Tan SL, Garcia-Barrio MT, Katze MG, et al. (1998) Inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR by vaccinia virus E3: role of complex formation and the E3 N-terminal domain. *Mol Cell Biol* 18: 7304–7316.
51. Beattie E, Kauffman EB, Martinez H, Perkus ME, Jacobs BL, et al. (1996) Host-range restriction of vaccinia virus E3L-specific deletion mutants. *Virus Genes* 12: 89–94.
52. Ludwig H, Suezzer Y, Waibler Z, Kalinke U, Schnierle BS, et al. (2006) Double-stranded RNA-binding protein E3 controls translation of viral intermediate RNA, marking an essential step in the life cycle of modified vaccinia virus Ankara. *J Gen Virol* 87: 1145–1155.
53. Zhang P, Jacobs BL, Samuel CE (2008) Loss of protein kinase PKR expression in human HeLa cells complements the vaccinia virus E3L deletion mutant phenotype by restoration of viral protein synthesis. *J Virol* 82: 840–848.
54. Malakhova OA, Zhang DE (2008) ISG15 Inhibits Nedd4 Ubiquitin E3 Activity and Enhances the Innate Antiviral Response. *J Biol Chem* 283: 8783–8787.
55. Brand S, Zitzmann K, Dambacher J, Beigel F, Olszak T, et al. (2005) SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 543–548.
56. Talon J, Horvath CM, Polley R, Basler CF, Muster T, et al. (2000) Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* 74: 7989–7996.
57. Bergmann M, Garcia-Sastre A, Carnero E, Pehamberger H, Wolff K, et al. (2000) Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J Virol* 74: 6203–6206.
58. Osiak A, Utermohlen O, Niendorf S, Horak I, Knobloch KP (2005) ISG15, an interferon-stimulated ubiquitin-like protein, is not essential for STAT1 signaling and responses against vesicular stomatitis and lymphocytic choriomeningitis virus. *Mol Cell Biol* 25: 6338–6345.
59. Yang YL, Reis LF, Pavlovic J, Aguzzi A, Schaffer R, et al. (1995) Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Embo J* 14: 6095–6106.
60. Rodriguez D, Rodriguez JR, Rodriguez JF, Trauber D, Esteban M (1989) Highly attenuated vaccinia virus mutants for the generation of safe recombinant viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 1287–1291.
61. Chang HW, Uribe LH, Jacobs BL (1995) Rescue of vaccinia virus lacking the E3L gene by mutants of E3L. *J Virol* 69: 6605–6608.
62. Garcia MA, Guerra S, Gil J, Jimenez V, Esteban M (2002) Anti-apoptotic and oncogenic properties of the dsRNA-binding protein of vaccinia virus, E3L. *Oncogene* 21: 8379–8387.
63. Davis BM, Humeau L, Dropulic B (2004) In vivo selection for human and murine hematopoietic cells transduced with a therapeutic MGMT lentiviral vector that inhibits HIV replication. *Mol Ther* 9: 160–172.
64. Matute-Bello G, Winn RK, Martin TR, Liles WC (2004) Sustained lipopolysaccharide-induced lung inflammation in mice is attenuated by functional deficiency of the Fas/Fas ligand system. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 358–361.